

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y ESTUDIO DE VIRULENCIA DE
AISLAMIENTOS DEL COMPLEJO *SCEDOSPORIUM APIOSPERMUM*.

POR

Q.B.P. CAROLINA ELIZABETH LUNA RODRÍGUEZ

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA

AGOSTO 2016

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y ESTUDIO DE VIRULENIA
DE AISLAMIENTOS DEL COMPLEJO *Scenedesmus apiospermum*.

Aprobación de la Tesis:



Dra. C. Gloria Ma. González González
Directora de tesis



Dra. C. Mariana Elizondo Zertuche
Co-directora de tesis



Dr. C. Miguel Ángel Becerril García
Comisión de tesis



Dra. Med. Raquel Garza Guajardo
Subdirectora de Estudios de Posgrado

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y ESTUDIO DE VIRULENCIA DE
AISLAMIENTOS DEL COMPLEJO *Scedosporium apiospermum*.**

Presentado por:

Q.B.P. Carolina Elizabeth Luna Rodríguez

Este trabajo se realizó en el Centro de Control de Enfermedades Infecciosas,
Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma
de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. C. Gloria Ma. González González,
y la co-dirección de la Dra. C. Mariana Elizondo Zertuche.



Dr. C. Gloria Ma. González González
Director de tesis

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos, por todo el apoyo y confianza que de forma incondicional me dan siempre, gracias.

A la Dra. Gloria, por permitirme realizar este proyecto, por dejarme conocer a una gran investigadora que transmite la pasión que tiene por lo que hace, gracias por alentarme a seguir adelante y por enseñarme que ante todo uno tiene que ser agradecido, responsable y humilde.

A la Dra. Mariana, me es muy grato haber sido su primer estudiante, de licenciatura y ahora de maestría, gracias por tenerme tanta paciencia y por permitirme conocer el gran ser humano que es, y sobre todo una gran investigadora, gracias.

A la Q.C.B. Lydia Oviedo por enseñarme todo el mundo de micología clínica, gracias, por usted aprendí todo lo que se, es una gran micóloga y una gran persona.

A todo el personal que trabaja en el CRCEI del departamento de microbiología, de cada uno aprendí siempre algo, muchas gracias.

A mi estimado Kevin, por ayudarme en todo el proyecto murino, gracias por ayudarme a seguir con mi conciencia un poco más tranquila y por hacer mucho muy amena toda esa etapa, muchas gracias chichaka.

A mis siempre incondicionales amigos Rubén y Valeria, por nunca dudar de mí y nunca dejarme sola, muchas gracias.

Alexandra y Álvaro, a ustedes dos en particular, quiero agradecerles todo el asesoramiento para sacar adelante este proyecto, sin ustedes creo no hubiera podido terminar, muchas gracias por siempre ayudarme con mis problemas raros y ser mis salvadores siempre, los quiero.

A Sonia por escucharme muchas veces en tiempos difíciles y por hacer amena toda esta aventura, muchas gracias.

Byron, gracias por siempre sacarme una sonrisa y siempre alentarme a no desanimarme, eres un ser humano excepcional, gracias por ser mi amigo.

A todos mis compañeros de maestría, de años anteriores, Liz, Rita y Luis, así como a los nuevos, Vanessa, Gerardo, Fernando y Orlando, muchas gracias por hacer estos dos años tan divertidos y de grandes enseñanzas.

A mí estimado amigo Gilberto, gracias por sacarme de muchos apuros y por enseñarme un poco de lo mucho que sabes de biología molecular.

Y por último, pero no menos importante a mi amigo Rogelio, gracias por aguantarme.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	PÁGINA
1. Introducción.....	1
1.1. Complejo <i>Scedosporium apiospermum</i>	1
1.2. Taxonomía.....	3
1.3. Morfología.....	5
1.4. Ecología.....	7
1.5. Infecciones causadas.....	9
1.6. Métodos de identificación.....	12
1.6.1. Cultivo.....	12
1.6.2. Microscopía.....	13
1.6.3. Serología.....	14
1.6.4. Molecular.....	15
1.6.4.1. Secuenciación.....	16
1.7. Susceptibilidad <i>in vitro</i>	19
1.8. Estudios de virulencia en modelo animales.....	21
 2. Justificación.....	 24
 3. Objetivos.....	 25
3.1. Objetivo general.....	25
3.2. Objetivos específicos.....	25
 4. Material y métodos.....	 26
4.1. Identificación molecular.....	26
4.1.1. Cepas.....	26
4.1.2. Extracción de ADN.....	26
4.1.3. PCR.....	28
4.1.3.1. Amplificación de región D1/D2.....	28
4.1.3.2. Amplificación de β -tubulina.....	28

4.1.4. Electroforesis en gel de agarosa.....	29
4.1.5. Purificación de las amplificaciones.....	29
4.1.6. Secuenciación.....	29
4.1.7. Alineamiento y análisis de las secuencias nucleotídicas.....	29
4.2. Modelo murino de supervivencia.....	30
4.2.1. Cepas.....	30
4.2.2. Preparación de inoculo.....	31
4.2.3. Estudio de supervivencia.....	32
4.2.4. Análisis estadístico.....	32
5. Resultados.....	33
5.1. Amplificación por PCR de los genes D1/D2 y β -tubulina.....	33
5.2. Identificación mediante análisis de las secuencias ITS, D1/D2 y β tubulina.....	34
5.3. Identificación mediante análisis filogenético.....	39
5.4. Estudio de supervivencia.....	42
6. Discusión.....	47
7. Conclusión.....	54
8. Referencias.....	55
9. Anexo.....	60

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Características morfológicas de las diferentes especies del complejo <i>S. apiospermum</i>	7
2. Clasificación de las diferentes infecciones causadas por especies del complejo <i>S. apiospermum</i>	9
3. Métodos moleculares utilizados para la identificación de las especies del complejo.....	16
4. Cepas utilizadas en el estudio de carga fúngica.....	31
5. Resultados de porcentajes de similitud obtenidos en BLAST en la identificación molecular de las 60 cepas con los tres marcadores moleculares utilizados.....	36
6. Identificación molecular de los 60 aislamientos del complejo <i>S. apiospermum</i> con los números de acceso en la base de datos Genbank para los genes D1/D2 y β -tubulina.....	41
7. Supervivencia de ratones infectados con especies del complejo <i>S. apiospermum</i>	44

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructuras de reproducción del género <i>Scedosporium</i>	6
2. Electroforesis en gel de agarosa 1.2% de fragmentos amplificados.....	33
3. Comparación de los cambios realizados en las identificaciones.....	35
4. Comparación en porcentajes de las identificaciones con los diferentes marcadores utilizados.....	38
5. Árbol de máxima verosimilitud basado en las secuencias ITS, D1/D2 y β -tubulina para los 60 aislamientos del complejo <i>S. apiospermum</i>	40
6. Cultivos en medio APD a partir de homogenizados de cerebro y bazo.....	43
7. Gráficas de supervivencia de ratones infectados con cepas del complejo <i>S. apiospermum</i>	45
8. Gráfica de supervivencia de ratones infectados con las especies del complejo <i>S. apiospermum</i> más virulentas de cada especie utilizada en este estudio.....	46

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
AFLP	Polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados
APD	Agar papa dextrosa
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ASD	Agar dextrosa Sabouraud
BLAST	Basic local alignment search tool
CMI	Concentración mínima inhibitoria
COX1	Citocromo oxidasa subunidad 1
CRCEI	Centro Regional de Enfermedades infecciosas
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
EF 1- α	Factor de elongación 1 alfa
EDTA	Disodio etilenediaminetetra-acetato
gr	Gramos
h	Hora
IPICYT	Instituto potosino de investigación científica y tecnológica
ISHAM	Sociedad internacional de micología humana y animal
ITS	Espaciador transcrito interno
L	Litro
LAMBAMA	Laboratorio nacional de biotecnología agrícola, médica y ambiental
LAMP	Amplificación isotérmica mediada por bucle
M	Molar
MCL	Máxima verosimilitud compuesta
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro
ML	Máxima verosimilitud
mM	Milimolar
MTS	Media de tiempo de supervivencia

NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramo
NL	Nuevo León
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-ESI-TOF/MS	PCR acoplada a espectrometría de masas por electrospray
PCR- RBL	PCR basado en hibridación reversa en línea
Q-PCR	PCR cuantitativa
RCA	Amplificación por círculo rodante
Rep-PCR	PCR basado en secuencias repetitivas
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SBA	Scedosporiosis broncopulmonar alérgica
SDS	Dodecil sulfato sódico
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
SNC	Sistema nervioso central
TAE	Tris-Ácido acético glacial-EDTA
TE	Tris-EDTA
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UFC	Unidad formadora de colonia
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
YPDA	Agar extracto de levadura, dextrosa y peptona
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
µM	Micromolar
°C	Grado centígrado
%	Por ciento

RESUMEN

Carolina Elizabeth Luna Rodriguez. Fecha obtención de grado: Agosto 2016

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Título del estudio: IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y ESTUDIO DE VIRULENCIA DE AISLAMIENTOS DEL COMPLEJO *Scedosporium apiospermum*.

Número de páginas: 63

Área de estudio: Microbiología

Propósito y Método de estudio: A nivel mundial la scedosporiosis es una micosis emergente con un amplio espectro de manifestaciones clínicas y de difícil tratamiento, cuya incidencia es cada vez mayor en pacientes inmunocomprometidos. Recientemente con base en estudios moleculares, se demostró que *Scedosporium apiospermum* es un complejo de especies crípticas, por lo que para llegar a una identificación precisa de las mismas se requiere el uso de más de un marcador molecular. Debido a que es considerado un grupo emergente, conocer la patogenicidad de las especies mediante un modelo *in vivo*, utilizando como parámetro el estudio de supervivencia en un modelo murino de scedosporiosis sistémica en ratones inmunocompetentes en conjunto con los estudios previamente realizados, permitirá ampliar el conocimiento de la virulencia de las diversas especies que constituyen este complejo.

Resultados y Conclusiones: Se identificaron 5 clados principales con el estudio filogenético con los tres genes (ITS, D1/D2 y β -tubulina), siendo el gen β -tubulina el que presentó una mayor resolución entre las especies crípticas *S. boydii*, *S. apiospermum* y *P. angusta*, mientras que *S. dehoogii* y *S. aurantiacum* pueden ser identificados con un solo marcador, ya sea ITS o D1/D2, ya que presentan una buena resolución para estas especies. Se encontró en el estudio de supervivencia que las dos cepas de *S. apiospermum* y *S. aurantiacum*, así como una cepa de *S. dehoogii* fueron las especies significativamente más virulentas matando el 100% de los ratones inmunocompetentes, mientras que las cepas de *S. boydii* y *P. angusta* presentaron una menor virulencia con mortalidades del 90% y 60% respectivamente.



Dr. C. Gloria Ma. González González

Directora de tesis



Dr. C. Mariana Elizondo Zertuche

Co-directora de tesis

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Complejo *Scedosporium apiospermum*

Tradicionalmente, la clasificación de los hongos se ha basado en sus características fenotípicas, hoy en día, los principales criterios de clasificación se han trasladado de fenotipo al genotipo, como resultado de ello, se llevó a cabo una profunda reorganización de las categorías fúngicas superiores, proponiéndose incluso un nuevo esquema taxonómico basado fundamentalmente en criterios moleculares¹. Estos estudios multigénicos han permitido demostrar que muchas especies, que tradicionalmente habían sido consideradas como simples morfo especies, constituyen en realidad un “complejo de especies”, en muchas ocasiones solo diferenciables molecularmente². A su vez, el análisis de secuencias de numerosos aislados clínicos ha incrementado sustancialmente la diversidad de especies capaces de ocasionar micosis³.

El término "complejo de especies" describe un grupo seleccionado de entidades que son difíciles de distinguir unos de otros y/o la clasificación de dichos grupos es todavía poco clara⁴, dichas especies se reconocen como crípticas, es decir, presentan variaciones genéticamente distinguibles, que fenotípicamente no pueden reconocerse como distintos.

Una consecuencia importante desde un punto de vista clínico radica en el hecho de que muchas de estas nuevas especies que forman parte de un agregado o complejo pueden diferir en algunos parámetros clínicamente relevantes^{3,5,6}. Por ejemplo, en el caso del complejo *Candida parapsilosis*, en un estudio realizado en México, se encontró que la especie *Candida parapsilosis sensu stricto* fue la única en mostrar resistencia frente a los antifúngicos fluconazol, caspofungina, anidulafungina y micafungina en comparación con las otras especies integrantes de este complejo, *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis*⁷.

En el caso de los hongos filamentosos, podemos mencionar el complejo *Scedosporium apiospermum*, que comprende cinco especies: *Scedosporium apiospermum sensu stricto*, *Scedosporium dehoogii*, *Scedosporium aurantiacum*, *Scedosporium boydii* y *Pseudallescheria angusta*. De forma importante, en los últimos años, se ha reportado que algunas de las especies se han descrito como el agente causal en infecciones oportunistas asociadas con una mortalidad elevada, ya que presentan una respuesta variable a los antifúngicos, dentro del grupo de los azoles, el voriconazol es el único que ha presentado actividad frente a *S. aurantiacum* mientras que *S. dehoogii* muestra una alta resistencia ha dicho antifúngico⁶.

La correcta identificación de las especies que conforman un complejo de hongos resulta esencial, ya que esto permitirá conocer el potencial patológico de dichas especies, así como conocer su respuesta a los antifúngico, el cual facilitaría el establecimiento de un tratamiento adecuado en una infección.

1.2 Taxonomía

Las especies del complejo *Scedosporium apiospermum* son hongos ascomycetos de la familia *Microascaceae*, este complejo de hongos ha sufrido cambios taxonómicos importantes desde su primer descripción a principios de 1910, inicialmente *Scedosporium apiospermum* se consideró la fase anamorfa (asexual) de *Pseudallescheria boydii* ⁸. Sin embargo, en los últimos años, varios estudios moleculares encontraron una importante variabilidad genética entre *P. boydii* y *S. apiospermum*, basados en varios marcadores genéticos como la región del espaciador transcrito interno (ITS), una región del gen calmodulina, dos regiones con el gen β -tubulina (BT2 y TUB), la región D1/D2 de la subunidad mayor del ARNr (LSU) y el gen del factor de elongación 1 alfa (EF-1 α), en conjunto con estudios morfológicos y bioquímicos de numerosos aislamientos clínicos y ambientales de diferentes países, se encontró que estos dos hongos son distintos, a su vez, se realizó la descripción de la fase teleomorfa de *S. apiospermum* (*Pseudallescheria apiosperma*) y la fase anamorfa de *P. boydii* (*Scedosporium boydii*)⁹⁻¹². Adicionalmente, con estos análisis se identificaron seis especies estrechamente relacionadas con *S. apiospermum*: *P. minutisporum*, *S. aurantiacum*, *S. dehoogii*, *P. angusta*, *P. ellipsoidea* y *P. fusoidea* ^{10,11}. Dependiendo de si se presentó o no la fase teleomorfa en estas especies, *Pseudallescheria* o *Scedosporium* se utilizaron, respectivamente, como el nombre del género, por la relación críptica de estas especies, se consideraron un complejo de hongos denominado complejo *Pseudallescheria/Scedosporium*.

Con la introducción de los estudios filogenéticos, se realizaron cambios en el Código de la nomenclatura de los hongos, dando lugar a cambios dramáticos en la denominación de los mohos y levaduras de importancia médica, en donde el sistema de denominación dual ya no es necesario. En 2011, se estableció el principio “un hongo=un nombre”,¹³ en la “Declaración de Ámsterdam sobre la nomenclatura de los hongos”¹⁴, en donde se solicitó la supresión del artículo 59 del Código de Nomenclatura Botánica, sobre la disposición de varios nombres para el mismo hongo. En virtud del nuevo código de nomenclatura de las algas, hongos y plantas, desde el 1 de enero de 2013, ya no se permite este sistema.

Como consecuencia en 2014 Lackner y col., realizaron una revisión general en la nomenclatura del género *Scedosporium*, *Pseudallescheria* y otros hongos relacionados, estableciendo estos nuevos cambios mediante un análisis filogenético con el gen D1/D2, dando prioridad al nombre genérico *Scedosporium* sobre *Pseudallescheria*, por ser el primero validado en 1919 por Castellani y Chalmers, por lo cual el complejo *Pseudallescheria/Scedosporium* pasó a ser el complejo *Scedosporium apiospermum* integrado por: *S. boydii*, *S. dehoogii*, *S. minutispora* (anteriormente *P. minutisporum*), *S. apiospermum (sensu stricto)* y *S. aurantiacum*. El estado taxonómico constituido por *P. angusta*, *P. fusioidea* y *P. ellipsoidea* actualmente está bajo estudio.

1.3 Morfología

Las especies del género *Scedosporium* se caracterizan por ser pleomórficas, es decir, pueden presentar una fase de reproducción teleomorfa como una anamorfa y de forma independiente puede presentar varios anamorfos (sinamorfos)³.

Se conocen dos tipos de reproducción anamorfa. Siendo la fase anamorfa que siempre está presente conocida como *Scedosporium*, caracterizada por presentar hifas hialinas septadas desde donde se originan conidios individuales o en pequeños grupos en los conidióforos alargados simples o desarrollados lateralmente en las hifas. Las conidias pueden ser ovales a claviformes de color café y su tamaño varía de $6-14 \times 5-6\mu\text{m}$ (Figura 1C). La conidiogénesis es anelídica.

Exceptuando a *S. dehoogii*, el anamorfo *Graphium*, se produce de forma más esporádica en colonias envejecidas y localizado usualmente en la periferia de la colonia. La conidiogénesis ocurre del mismo modo que *Scedosporium* pero se observa la formación de coremios (Figura 1B), los cuales están constituidos por conidios claviformes, subhialinos o marrón pálido, de base trunca y su tamaño oscila entre $6-12 \times 3.5-4\mu\text{m}$. Dichos conidios son mucosos y se acumulan en el ápice del conidióforo formando grandes masas de color amarillo o grisáceo^{8,15}.

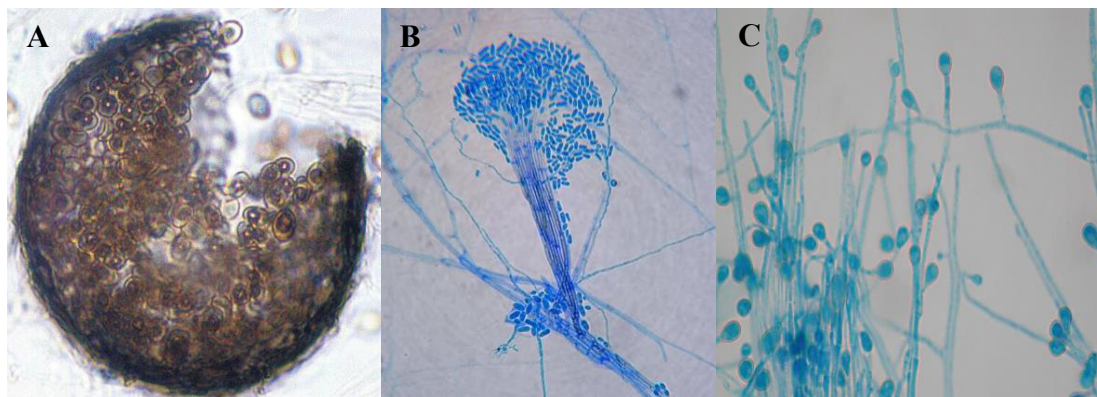


Figura 1. Estructuras de reproducción del género *Scedosporium*. (A) Cleistotecios en la fase teleomorfa *Pseudallescheria*. (B) Coremio de la fase anamorfa *Graphium*. (C) Conidias de origen anelídico en la fase anamorfa *Scedosporium*.

Finalmente la fase teleomorfa conocida como *Pseudallescheria*, se presenta con mayor frecuencia en medios de cultivo de bajo contenido nutricional. Se ha descrito esta fase para algunas de las especies del complejo como: *S. minutispora*, *S. apiospermum* y *S. boydii*. La fase se caracteriza por la producción de ascomas cerrados (cleistotecios) de color amarillo parduzco o negro, esféricos y con un diámetro aproximado de 140 a 200 μm de diámetro, los cuales frecuentemente se presentan sumergidos en el agar. En el interior del ascoma se encuentran las ascosporas que tienen forma elipsoidal, color dorado y su tamaño oscila entre $6-7 \times 3.5-4 \mu\text{m}$ (Figura 1A) ^{8,12,15}.

En el medio de cultivo agar dextrosa sabouraud (ADS) las colonias de las especies del complejo *S. apiospermum* alcanzan de 40 a 60 mm de diámetro después de una incubación a 25°C durante 14 días. Las colonias tienen aspecto algodonoso o aterciopelado, son planas con bordes definidos o irregulares presentando un color blanco inicialmente y conforme maduran adquieren coloraciones de marrón a gris, exceptuando a la especie *S. aurantiacum*, en la cual se puede observar un pigmento amarillo difusible en el medio. Estos hongos pueden crecer en ambientes

microaerófilos, presentan tolerancia a concentraciones de 5% NaCl en cultivo líquido y pueden utilizar gas natural y compuestos aromáticos como fuente de carbono^{8,15,16}.

Tabla 1. Características morfológicas de las diferentes especies del complejo *S. apiospermum*

Especie	Pigmento difusible amarillo ^a	Crecimiento a		Teleomorfo (cleistotecio)	Sinamorfo (coremio)	Conidios
		40°C	45°C			
<i>S. apiospermum</i>	V	+	-	+	+	Globoso a subgloboso, pared delgada
<i>S. aurantiacum</i>	+	+	+	-	+	Principalmente ovoide, pared delgada
<i>S. boydii</i>	V	+	-	+	+	Globoso a subgloboso, pared delgada
<i>S. dehoogii</i>	-	-	-	-	-	Principalmente ovoide, pared delgada
<i>S. minutisporum</i>	-	+	-	+	+	Elipsoidal ovoide, pared delgada

V, variable. ^a en medio agar papa dextrosa (APD) a 25°C

1.4 Ecología

Las especies de este complejo son hongos saprofitos, cosmopolitas, que se encuentran preferentemente en climas templados y tropicales. Aunque su nicho natural aún no está bien elucidado, el aislamiento de estos hongos está relacionado con suelos donde se presenta una alta actividad humana, debido a la probable contaminación orgánica, además donde el contenido de componentes de nitrógeno es ubicuo, como en suelos agrícolas, jardines urbanos, sedimentos de aguas contaminadas, etc. Asimismo, se han podido aislar en suelos que muestran rangos

de pH de 6 a 8. En áreas naturales como bosques, es muy raro el aislamiento de estos hongos ^{8,16}.

Se ha sugerido que cada especie de este complejo tiene una preferencia ecológica. Esto quedó demostrado en un trabajo realizado en Francia, en donde estudiaron suelos de áreas con alto impacto humano (áreas agrícolas, industriales, lodos de plantas tratadoras de aguas, parques infantiles) y de bosques. *S. aurantiacum* se aisló principalmente en áreas agrícolas, *S. dehoogii* fue más frecuente en áreas con alta actividad humana (áreas agrícolas e industriales), *S. boydii* se pudo encontrar en todos los ambientes muestreados que se consideraron con alto impacto humano, mientras que en las muestras tomadas de bosques no se encontró ninguna especie de este complejo ¹⁷.

Sin embargo, este patrón de distribución puede variar de un país a otro. En México, se llevó a cabo un muestreo de suelos con alta actividad humana en 26 estados de la república, obteniendo un total de 109 aislamientos, identificando mediante la secuenciación de la región ITS a 7 especies del complejo *S. apiospermum* (*S. apiospermum*, *S. boydii*, *S. aurantiacum*, *S. dehoogii*, *P. angusta*, *P. fusoidea* y *P. ellipsoidea*). La mayoría de las especies del complejo se aislaron de parques públicos, parques deportivos, áreas industriales, lodos de planta tratadora de agua y jardín de casa. *S. boydii* se aisló en todos los ambientes estudiados, mientras que *S. dehoogii* se encontró mayormente en lodos de plantas tratadoras de agua, *P. angusta* únicamente se aisló en muestras de parque deportivo y jardín de casa; el

jardín urbano fue la muestra con mayor frecuencia de aislamiento de las especies del complejo ¹⁸.

1.5 Infecciones causadas

Actualmente, algunas de las especies de este complejo como son *S. aurantiacum*, *S. boydii* y *S. apiospermum*, son consideradas patógenas oportunistas emergentes, debido al aumento de casos de infecciones causadas por ellos, principalmente en sujetos con inmunosupresión y recientemente también se han reportado patologías en sujetos inmunocompetentes ^{4,15}. Los diversos cuadros clínicos ocasionados por estos hongos que se presentan en el ser humano se denominan conjuntamente como scedosporiosis (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de las diferentes infecciones causadas por especies del complejo *S. apiospermum*

Tipo de afección	Ubicación	Manifestación clínica
Colonización	Vías respiratorias	Bola fúngica Scedosporiosis broncopulmonar alérgica (SBA)
Infección	Localizada	Micetoma Nódulos subcutáneos Queratitis Osteomielitis Sinusitis Artritis Otitis
	Invasiva	Neumonía Endocarditis Absceso cerebral Meningitis Meningoencefalitis

Entre las scedosporiosis se encuentran de forma más frecuente las infecciones localizadas, principalmente los micetomas, como resultado de inoculaciones por traumatismo o herida penetrante, tras la contaminación con suelo o estiércol, afectando de forma frecuente la extremidad inferior del cuerpo. Sin embargo, la extremidad superior, inclusive los ojos, después de la introducción de un cuerpo extraño contaminado, también pueden verse afectados ^{19,20}. Micetomas causados por especies del complejo *S. apiospermum* se caracterizan por el desarrollo de los hongos en los tejidos como granos blancos y están involucrados en aproximadamente 10 % de los casos reportados ^{8,21}, estas infecciones pueden ser fatales en pacientes inmunocomprometidos.

La ruta más frecuente de entrada en las infecciones de scedosporiosis ocurre por medio del tracto respiratorio, siendo aquellos sujetos con inmunosupresión los más susceptibles a desarrollar una colonización asintomática o sintomática de vías respiratorias. Se ha reportado en pacientes positivos para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), con una frecuencia del 68.7% el aislamiento de estos hongos, en donde pulmones y senos paranasales son los sitios más colonizados ²². Otros síndromes respiratorios como sinusitis, infecciones pulmonares y scedosporiosis broncopulmonar alérgica (SBA) se han asociado con la inhalación de conidias de hongos de este complejo ^{8,23}. Por otro lado, se ha reportado en pacientes que tienen una cavidad pulmonar preexistente (bronquiectasias, tuberculosis, sarcoidosis, fibrosis quística), la formación de bolas fúngicas, indistinguibles radiológicamente a un aspergilloma ^{8,15}.

En pacientes con fibrosis quística, especies del complejo *S. apiospermum* se aíslan regularmente, colocando a este complejo fúngico como el segundo más frecuente en individuos con esta patología ²⁴. En Australia, *S. aurantiacum*, fue el segundo hongo más frecuentemente aislado en pulmones de pacientes con fibrosis quística después de *Aspergillus fumigatus* con una frecuencia del 17% de los casos ²⁵.

Se han reportado infecciones invasivas diseminadas, causadas por este complejo de hongos, las cuales se presentan principalmente en pacientes inmunosuprimidos, individuos con linfopenia, neutropenia, que han recibido tratamiento con esteroides, o con infecciones producidas por microorganismos tales como el VIH^{8,26,27}. En Australia, se llevó a cabo un estudio sobre las infecciones invasivas causadas por hongos filamentosos diferentes del género *Aspergillus*, determinando su epidemiología y factores de comorbilidad, encontraron que dichas infecciones fueron causadas por un grupo diverso de patógenos, siendo los mucormicetos los más frecuentes aislados con un 45.7% de los casos, seguidos de especies del complejo *S. apiospermum* con 33.3%, así como *Fusarium* con un 8%. Las enfermedades pulmonares crónicas, los trasplantes de órganos sólidos y traumatismos se encontraron como los factores de predisposición más importantes en pacientes con *scedosporiosis* invasiva ²⁸.

En Alemania se reportó que de 22 pacientes con síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), 12 (54.5%) pacientes presentaron una *scedosporiosis* invasiva reportando afección al sistema nervioso central (SNC) en 41.7% de los casos. Por otro lado, en pacientes sanos que sufren una inmersión accidental en aguas

contaminadas (del inglés *near drowning*), ocurrido principalmente en desastres naturales, se reportó un porcentaje similar de afección al SNC, con una mortalidad del 75% ²². Las infecciones fúngicas después de sufrir *near drowning* se han reportado mayormente causadas por especies del complejo *S. apiospermum* ²⁹⁻³¹, en donde no solo el hongo se puede aislar de vías respiratorias, sino que presentan una diseminación hacia SNC, con *S. apiospermum* como el microorganismo más frecuentemente reportado. *S. aurantiacum* y *S. boydii* se han reportado en menor frecuencia ^{29,30}. El tratamiento de elección para las infecciones producidas por este complejo aún no ha sido bien establecido.

1.6 Métodos de identificación

Numerosos métodos se han descrito para la identificación de las especies de este complejo. En el laboratorio, se incluyen desde métodos convencionales como el cultivo, microscopia y serología, hasta diversas técnicas moleculares.

1.6.1 Cultivo

Las especies de este complejo crecen bien en medios de cultivo de rutina para bacterias, tales como agar sangre y agar chocolate o en medios para hongos como el medio ADS, agar papa dextrosa (APD) y el agar extracto de levadura, dextrosa y peptona conocido por su acrónimo inglés YPDA (Yeast Peptone Dextrose Adenine). Existen tres medios semi-selectivos diferentes: YPDA complementado con cicloheximida ²⁴, SceSel+ ³² y Scedo-Select III ³³, que facilitan

en gran medida la detección de las especies pertenecientes al complejo *S. apiospermum*. La selectividad de los dos primeros medios se basa en la inhibición parcial o total del crecimiento de un gran número de hongos contaminantes por la cicloheximida, o la combinación de dicloran y benomilo en el caso del medio SceSel+.

El medio de cultivo Scedo-Select III se basa en la capacidad de las especies del complejo *S. apiospermum* para utilizar compuestos alifáticos o aromáticos como única fuente de carbono y energía, así como la asimilación de amonio como fuente de nitrógeno, suplementado con benomilo (mientras que otros hongos filamentosos tales como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Paecilomyces* son más sensibles a este inhibidor de la polimerización de tubulina) para hacerlo más selectivo; pero hasta la fecha, su uso se ha reportado sólo en un estudio de muestras ambientales.

1.6.2 Microscopia

Para el diagnóstico a partir de muestras clínicas, se realizan técnicas de microscopía de fluorescencia utilizando Blankophor, Uvitek 2B o calcoflúor blanco M2R después de una etapa inicial de inmersión de las muestras en KOH al 20%, pero éstas no permiten la discriminación del complejo *S. apiospermum* de otros hongos filamentosos. Por el contrario, la identificación exitosa mediante inmunohistoquímica del complejo *S. apiospermum* se reportó por Kaufman y col. utilizando anticuerpos policlonales fluorescentes ³⁴.

Recientemente, Thornton en 2009, desarrolló dos anticuerpos monoclonales reconociendo un epítipo de carbohidrato en un antígeno no identificado presente en las paredes celulares de los conidios y las hifas que son específicos de las tres especies patógenas más comunes del complejo (es decir, *S. apiospermum*, *S. boydii* y *S. aurantiacum*). Mientras que se observaron algunas reacciones cruzadas con antígenos de *Pseudallescheria africana* y *Lophotricus fimeti*, estos anticuerpos monoclonales pueden usarse en un ensayo de diagnóstico para el complejo *S. apiospermum* en el futuro.^{15,35}

1.6.3 Serología

Hasta la fecha, no hay reactivos comerciales o kits que estén disponibles para detectar una sensibilización o para el diagnóstico serológico en una infección causada por especies de este complejo.

Las infecciones causadas por especies del complejo *S. apiospermum* pueden ser diagnosticadas usando la detección de antígenos por la contrainmunolectroforesis, pero se pueden producir reacciones cruzadas con antígenos de otros hongos tales como *Aspergillus spp.*²⁴. Pinto *et al.* aislaron un péptido polisacárido, un antígeno péptido ramnomanano del micelio de *P. boydii*, los autores también proporcionan pruebas de que a pesar de que estos antígenos son similares a péptidos sacáridos de *Sporothrix schenckii* no reaccionan en forma cruzada con estos y que se diferencian de los principales glicoconjugados presentes en *Aspergillus spp.* Por

tanto, es posible en el futuro el desarrollo de una prueba de diagnóstico mediante antígenos para *P. boydii*³⁶.

1.6.4 Técnicas moleculares

Una amplia gama de técnicas moleculares se han utilizado en la identificación de las especies del complejo, tal como se resumen en la Tabla 3. Métodos como PCR-RBL, RFLP, RCA o AFLP, son herramientas prometedoras para la diferenciación de las especies del complejo³⁷⁻³⁹.

Por otra parte, se están realizando actualmente varios estudios de diversos métodos que permitan la detección directa y la identificación de la totalidad de las especies de hongos que se puedan encontrar en muestras clínicas, tales como los microarreglos y el uso de PCR múltiple dirigido a secuencias conservadas del genoma seguido de ionización por electrospray de los productos amplificados y la separación de los iones obtenidos con una identificación final por espectrometría de masas (PCR-ESI-TOF/MS).

Sin embargo, la mayoría de estas técnicas han mostrado especificidad variable y solo se ha conseguido identificar algunas de las especies de forma precisa, es por ello que hoy en día la técnica de secuenciación de distintos genes sigue siendo el estándar de oro para la identificación de las especies del complejo.

Tabla 3. Métodos moleculares utilizados para la identificación de las especies del complejo.

Técnica	Identificación de especies	Marcador blanco	Referencias
PCR convencional	No	ITS	Wedde <i>et al.</i> 1998
PCR múltiple y ensayo de fase líquida	No	ITS	Buelow <i>et al.</i> 2012
Q-PCR	No No	ITS β -tubulina (TUB)	Castelli <i>et al.</i> 2008
Secuenciación	Si	β -tubulina (TUB) ITS	Gilgado <i>et al.</i> 2005; Gilgado <i>et al.</i> 2008; Lackner <i>et al.</i> 2014
Microarreglo de oligonucleótidos	No	ITS	Bouchara <i>et al.</i> 2009
PCR basado en secuencias repetitivas (Rep-PCR)	No	-	Steinmann <i>et al.</i> 2011; Matray <i>et al.</i> 2015
PCR basado en Hibridación Reversa en Línea (PCR-RBL)	Si (no especifica para <i>S. dehoogii</i>)	β -tubulina (TUB)	Qiaoyun Lu <i>et al.</i> 2011; Q. Lu <i>et al.</i> 2011
Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)	Si	β -tubulina (TUB)	Qiaoyun Lu <i>et al.</i> 2011
Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)	Si	ITS	Lackner <i>et al.</i> 2012
La amplificación por círculo rodante (RCA)	Si	ITS	Lackner, <i>et al.</i> 2012
Polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)	Si	β -tubulina (TUB)	Lackner <i>et al.</i> 2012
PCR acoplada a espectrometría de masas por electrospray (PCR-ESI-TOF/MS)	No	ITS D1/D2 β -tubulina (TUB)	Massire <i>et al.</i> 2013

1.6.5 Identificación mediante secuenciación

La identificación mediante secuenciación, puede ser complicada, debido a la enorme cantidad de información en bases de datos públicas y a los cambios constantes en la taxonomía en micología.

Es por eso que el uso de un ADN *barcoding*, fue propuesto por primera vez en micología por Hebert *et al.* El fundamento de este procedimiento se basa en el uso de una secuencia corta (500-800pb) genéticamente diversa que esté flanqueada por una región conservada conocida que permita el diseño de oligos universales, de esta forma, se podrán realizar identificaciones de los organismos de todos los reinos hasta el nivel especie, mediante la comparación de secuencias de referencia de colecciones de especies bien identificadas. Esto permitiría identificar organismos de una forma rápida y efectiva, independiente del cultivo, en forma universal, accesible y sin necesidad de expertos ⁴⁹.

La necesidad de implementar tales protocolos en micología es evidentemente clara, por lo tanto, en 2015, la Sociedad Internacional de Micología Humana y Animal ISHAM por su acrónimo en inglés (International Society of Human and Animal Mycology), organizó un grupo de trabajo con el fin establecer un *barcoding* para la identificación de hongos de importancia médica, así como la creación de una base de datos confiable y accesible con hongos de referencia ⁵⁰.

El locus más utilizado para los estudios micológicos basados en el ADN a nivel subgenérico, y por lo tanto para la identificación de especies, es la región ITS. Este segmento multicopia, tripartito y de aproximadamente 550 pb, combina las ventajas de tener una resolución a diversas escalas con la facilidad de amplificación de una región de múltiples copias en un producto fácilmente obtenible cuya variabilidad refleja típicamente sinamorfias a nivel de especies ⁵¹⁻⁵³. Adicionalmente, en la búsqueda del *barcoding*, se evaluaron otros loci que podrían cumplir las deficiencias

ocasionales de la región ITS, como pleomorfismo y dificultades en la alineación, entre los cuales se encuentran: el citocromo oxidasa subunidad 1 (COX1), los genes codificantes de proteínas como la ARN polimerasa I y II, el gen EF-1 α y el gen β -tubulina. Sin embargo, la dificultad asociada con el diseño de oligos universales para estas secuencias así como una baja especificidad en algunos casos, determinó el establecimiento de la región ITS como el *barcoding* universal en micología^{50,52}.

Sin embargo, para la identificación de las especies de los complejos *Cryptococcus neoformans*/C. *gattii*, *Fusarium solani*, *Scedosporium apiospermum* y *Tricophyton* se encontró que no presentan un *barcoding gap* con el gen ITS⁵⁰. El *barcoding gap* es la diferencia entre la distancia más grande intraespecífica y la distancia más pequeña interespecífica, si es que existe, significa que se puede establecer un valor de corte para la delimitación de especies, ya que no hay superposición entre la intra e interespecífica distancia⁵⁴. Por lo cual, el uso del gen ITS por sí solo, no presenta un soporte adecuado en la discriminación de las especies que no presentan un *barcoding gap*, por lo cual se requiere complementar con otros marcadores genéticos o con técnicas moleculares, en cada caso en particular, permita diferenciar los integrantes de estos complejos. En el caso del complejo *S. apiospermum*, para poder esclarecer de forma precisa las especies, el ISHAM recomienda el uso de la amplificación de la región de la subunidad mayor del ARNr (LSU), el gen β -tubulina (BT2) o por medio de la técnica polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados, más conocido por su acrónimo inglés AFLP (Amplified fragment length polymorphism)⁵⁰. La identificación de la especie exacta puede ser importante para el

manejo clínico, debido a que se han reportado que las especies presentan una susceptibilidad variable a la mayoría de los antifúngicos probados.

1.7 Susceptibilidad *in vitro*

Una característica importante del género *Scedosporium* es que la mayoría de las especies presenta una resistencia intrínseca a una amplia variedad de antifúngicos. La mayoría de estudios publicados al respecto de las pruebas de susceptibilidad realizadas *in vitro*, utilizando antifúngicos tradicionales (anfotericina B, fluconazol) o más recientes (voriconazol), muestran una alta resistencia en casi todas las cepas estudiadas^{8,55,56}.

En una revisión en la literatura de los últimos años de los estudios publicados de susceptibilidad *in vitro* del grupo de los triazoles en las especies del complejo *S. apiospermum*, se encontraron que de 521 aislamientos de origen clínico y ambiental, la susceptibilidad *in vitro* para itraconazol, posaconazol, y voriconazol fue altamente variable, con rangos desde 0.016 a >16 mg/L, los valores más bajos frecuentemente son para voriconazol. *P. ellipsoidea*, *S. minutisporum*, *S. aurantiacum*, *S. boydii* y *S. dehoogii* presentaron menos susceptibilidad para posaconazol con un rango de 0.5a >16 mg/L⁶. Voriconazol es el único triazol en mostrar actividad sobre *S. aurantiacum* con un rango de 0.5-1 µg/mL, mientras que anfotericina B, itraconazol, caspofungina, micafungina, isavuconazol y anidulafungina mostró resistencia. *S. dehoogii* fue el más resistente para voriconazol con un valor >16 µg/mL, mientras que *P. angusta* tienen un perfil de resistencia a los triazoles⁵⁷.

En México, se llevó a cabo un estudio *in vitro* sobre la eficacia de diversos antifúngicos frente a las especies del complejo *S. apiospermum*. Se encontró que las diferentes especies del complejo presentaron una concentración mínima inhibitoria (CMI) muy alta, con rangos de 8 - >16 µg/mL para anfotericina B, >8 µg/mL para las equinocandinas: caspofungina, micafungina y anidulafungina, 8-64 µg/mL para fluconazol y >64 µg/mL para 5-flucitocina, lo que demostró la resistencia a los antifúngicos probados en este estudio ¹⁸.

Respecto a la correlación que existe entre los resultados de susceptibilidad *in vitro* y los resultados de estudios *in vivo*, hay mucha controversia. Para algunos hongos, particularmente el caso de las levaduras del género *Candida* y *Cryptococcus*, hay una aceptable correlación entre ambos estudios, sin embargo, en hongos filamentosos, no se ha logrado esta relación. No obstante, se acepta el hecho de que si una cepa es susceptible *in vitro* no es suficiente para predecir el éxito terapéutico del tratamiento. Sin embargo en el 90% de las veces, los aislamientos susceptibles *in vitro* responden al tratamiento terapéutico. Pero, si una cepa muestra resistencia *in vitro*, es más probable el fracaso en el tratamiento con ese compuesto; por otro lado, puede existir una respuesta positiva al tratamiento con ese compuesto en el 60% de las veces ⁵.

Se han desarrollado varios estudios *in vivo* en modelos animales con scedosporiosis diseminada, que demuestran que las dosis de antifúngico de uso común suelen ser ineficaces contra estos hongos ⁵⁸. La correcta identificación específica del agente causal en una scedosporiosis, es importante debido a la variabilidad en la virulencia y

en la susceptibilidad observada en las diferentes especies que integran este complejo, así mismo, para establecer un diagnóstico oportuno y administrar un tratamiento apropiado.⁵⁹

1.8 Estudios de virulencia en modelos animales

Los modelos animales de infecciones por hongos son una herramienta clave en el avance de la Micología Médica. Muchos tipos diferentes de modelos animales de infección por hongos se han desarrollado, teniendo a los modelos murinos como los más utilizados para estudios de patogenia, virulencia, respuesta inmune, diagnóstico y eficacia terapéutica. El estudio comparativo de la virulencia de cepas de hongos (múltiples cepas de la misma especie de microorganismo) se ha estudiado en estos modelos, en donde las comparaciones se han hecho con base en la letalidad observada o en la carga fúngica en los tejidos blanco. La severidad se evalúa principalmente por la mortalidad y la recuperación cuantitativa del hongo en los órganos afectados, mientras que la histopatología de los tejidos afectados y la respuesta del huésped nos dan una imagen de la interacción entre el huésped y el patógeno *in vivo*⁶⁰.

En la actualidad, se han reportado varios modelos murinos de infección con especies del complejo *S. apiospermum*, utilizando como parámetros de patogenicidad la mortalidad en un período establecido determinaciones de carga fúngica en algunos órganos en animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos.

En el 2002 González y col., desarrollaron un modelo murino de scedosporiosis sistémica en ratones inmunocompetentes e inmunosuprimidos, utilizando inóculos desde 1×10^3 UFC/mL hasta 5×10^6 UFC/mL. Los resultados mostraron que la mortalidad de los ratones se correlacionó con la concentración del inóculo y la inmunosupresión. La infección sistémica afectó una gran variedad de órganos como hígado, bazo y cerebro encontrando en ellos estructuras fúngicas, tanto en ratones inmunocompetentes como inmunosuprimidos. Sin embargo, el cerebro fue el órgano más afectado en ambos grupos. La infección prevaleció en los ratones inmunocompetentes sobreviviendo un 25% y 37% al día 25, mientras que los ratones inmunosuprimidos presentó una mortalidad del 100 % en los días 3 y 6 post-infección con inóculos de 1×10^6 UFC/mL y 1×10^5 UFC/mL.

En un estudio realizado por Guarro y col, utilizando un modelo murino de scedosporiosis sistémica, se evaluaron dos cepas de cada uno de los siguientes microorganismos: *S. boydii*, *S. minutisporum*, *S. apiospermum*, *S. aurantiacum* y *S. dehoogii*. Utilizaron un inóculo de 1×10^6 UFC/mL en ratones inmunocompetentes. Encontrando que *S. aurantiacum* y *S. dehoogii* fueron las especies más virulentas causando la muerte del 80% y 70% de los ratones respectivamente en un periodo de 30 días, el resto de las especies solo causó del 0–20% de muerte en ese mismo período ⁶¹.

Harun y col, estudiaron la virulencia de cepas de *S. aurantiacum* de aislamientos clínicos, en un modelo murino de scedosporiosis sistémica, utilizando ratones inmunocompetentes. Evaluaron la supervivencia como marcador de patogenicidad

en los animales durante un periodo de 30 días. Encontrando que las diferentes cepas mostraron diferentes comportamientos de virulencia, presentando mortalidades del 100% hasta el 60% ⁶².

En México en 2014, Elizondo y col realizaron un estudio de carga microbiana en un modelo de scedosporiosis sistémica en ratones inmunocompetentes, para las especies *S. aurantiacum*, *S. apiospermum*, *S. boydii*, *S. dehoogii* y *P. angusta*, así como su tropismo hacia los distintos órganos. Se realizaron mediciones de UFC/gr tejido a los 3, 6 y 15 post-infección en cerebro, bazo y riñón para cada especie. Los resultados mostraron que en la mayoría de las cepas se tuvo una mayor carga fúngica en cerebro, en comparación con los otros órganos, siendo *S. apiospermum*. *S. aurantiacum* y *S. dehoogii* las que presentaron una mayor carga fúngica en cerebro¹⁸. Sin embargo, en este estudio, no se llevó a cabo el estudio de sobrevivencia para las mismas especies del complejo, razón por la cual para este trabajo se pensó en realizarlo y complementar la información previa con los datos originados por nuestro equipo de trabajo.

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN.

Estudios previos realizados en el departamento de Microbiología, identificaron mediante secuenciación de la región ITS siete especies del complejo *Scedosporium apiospermum*. Sin embargo, se ha demostrado que estas especies crípticas requieren la secuenciación de más de un gen para llegar a una identificación precisa. Así mismo, para complementar el estudio de carga microbiana previamente realizado, es necesario llevar a cabo un estudio de supervivencia en un modelo murino de scedosporiosis sistémica. Llevar a cabo estos dos estudios brindará conocimiento nuevo y preciso sobre los aislamientos obtenidos en este país.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Corroborar la identificación previa realizada con la región ITS de los aislamientos del complejo *Scedosporium apiospermum* mediante la secuenciación parcial de otros genes conservados y evaluar la virulencia mediante estudios de supervivencia en un modelo murino de infección sistémica.

3.2 Objetivos específicos

1. Corroborar la identificación de las especies del complejo *Scedosporium apiospermum* mediante la secuenciación de la región parcial de los genes D1/D2 del ADNr y β -tubulina.
2. Determinar la virulencia de las especies del complejo de *S. apiospermum* mediante un estudio de supervivencia en un modelo murino de scedosporiosis.

CAPÍTULO 4

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Identificación molecular

4.1.1 Cepas

Se utilizaron un total de 60 cepas del complejo *Scedosporium apiospermum*, las cuales fueron proporcionadas por el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas (CRCEI) de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Se reactivaron en medio APD durante 7 días a una temperatura de 30 °C.

4.1.2 Extracción de ADN

A partir de cultivos puros en APD incubados durante 7 días a 30 °C, se realizó la extracción de ADN del micelio mediante un protocolo de shock térmico y lisis enzimática¹⁸. En un tubo eppendorf de 2 mL se colocaron 100 µL de agua estéril. Se raspó la colonia del hongo filamentoso con un aplicador estéril y se transfirió el micelio al tubo eppendorf. Se realizó un choque térmico consistente en calentamiento a 99 °C por 3 min (baño maría) y transfiriendo inmediatamente a congelación en hielo seco durante 3 min. Se repitió este procedimiento 7 veces. Se permitió atemperar.

Se agregaron 200 μ L de buffer de lisis enzimática (20 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM EDTA, 1.2% Triton X-100) agregando lisozima y quitinasa a una concentración de 2 mg/mL respectivamente, se mezclaron e incubaron a 37 °C en agitación por 12 h. Se agregaron 300 μ L de solución TE 1X, 90 μ L de SDS al 10% y 5 μ L de proteinasa K, se mezcló e incubó a 55°C por 1 h. Se agregaron 100 μ L de solución NaCl 5 M y 80 μ L de CTAB/NaCl, se mezcló e incubó a 65°C por 1h.

Para la separación de la fase orgánica y acuosa se agregaron 300 μ L de SEVAGE, 250 μ L de fenol saturado y 10 μ L de solución TE 1X, se mezcló en vortex durante 1 min y se centrifugó a 13000 rpm por 8min. Se desechó la fase orgánica y la fase acuosa obtenida se transfirió a un tubo eppendorf nuevo de 2 mL. Se repitió una vez el paso para separar la fase orgánica y acuosa. Posteriormente para la precipitación del ADN en la fase obtenida (1mL o menos) se agregaron 900 μ L de alcohol isopropílico (isopropanol) al 100% y 240 μ L de acetato de sodio ($C_2H_3NaO_2$) 3 M, se mezcló y dejó a -20°C durante 12 h. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 10 min desechando el sobrenadante, obteniendo una pastilla la cual se lavó con 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó a 13000 rpm por 8 min, se desechó el sobrenadante y se repitió el lavado dos veces.

Se dejó secar la pastilla a 55°C hasta que no quedaran residuos de etanol; se suspendió la pastilla en 50 μ L de agua mili Q estéril y se calentó a 65 °C por 15 min. Se cuantificó el ADN obtenido mediante espectrofotometría (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) y se almacenó a -20°C.

4.1.3 PCR

Las reacciones de PCR para los dos genes (D1/D2 y β -tubulina) se llevaron a cabo en un termociclador C1000 Touch™ ThermalCycler (BIORAD) para tubos Eppendorf de 0.2 mL utilizando las condiciones y cebadores que a continuación se describen en cada caso particular.

4.1.3.1 Amplificación de la región D1/D2

Se utilizaron los siguientes cebadores: F63 (5'-GCAT ATCA ATAA GCGGAGG AAAAG-3') y R635 (5'-GGTCC GTGTT TCA AGACG-3'). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 30 μ l que incluyeron: 15 μ l de GoTaq® Colorless Master Mix (1X), 2.4 μ L de cada primer (0.5 mM) y 60-100 ng de ADN templado. Las condiciones de la reacción fueron: 95 °C por 4 min, seguido de 30 ciclos consistentes en: 94 °C por 1 min, 55 °C por 1.30 min, 72 °C por 1.30 min y 72 °C por 5 min.

4.1.3.2 Amplificación del gen β -tubulina

Se utilizaron los siguientes cebadores Bt2a (5'-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC-3') y Bt2b (5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3'). Se realizaron dos tipos de reacciones de prueba en volúmenes de 10 μ L conteniendo: 5 μ L de GoTaq® Colorless Master Mix (1X), 0.8 μ L de cada cebador (0.8 mM) y 60-100 ng de ADN templado. Se utilizaron las siguientes condiciones: 95 °C por 4 min, 35 ciclos consistentes en: 94 °C por 45 s, 60 °C por 30 s, y 72 °C por 2 min.⁶³

4.1.4 Electroforesis en gel de agarosa

Todas las reacciones se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Se preparó al 1.5% en una solución de TAE 1X; se utilizó 2 µL de amortiguador de carga y 3 µL de los productos de PCR.

4.1.5 Purificación de las amplificaciones

Los productos amplificados fueron purificados con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI) bajo los lineamientos del fabricante. El ADN purificado se almacenó a -20°C hasta su secuenciación.

4.1.6 Secuenciación

Las secuenciaciones se realizaron mediante el método de didesoxinucleótidos marcados en el secuenciador automatizado 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) a través de los servicios del Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) en San Luis Potosí, S.L.P.

4.1.7 Alineamiento y análisis de las secuencias nucleotídicas

Las secuencias obtenidas se editaron en el programa GeneStudio™ Professional Edition Version 2.2.0.0 (GeneStudio, Inc) así como la revisión de los

electroferogramas. La edición se realizó bajo criterios conservadores como el recorte de los extremos de las secuencias que mostraban bajo nivel de calidad en la lectura, de manera que todas tuvieran la misma longitud y marco de lectura para los genes amplificados D1/D2 y β -tubulina. Posteriormente, se realizó una comparación de las secuencias obtenidas con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) así como en la base de datos Mycobank (<http://www.mycobank.org/>).

El alineamiento múltiple de las secuencias de los genes D1/D2 y β -tubulina se realizó mediante el programa *Muscle* del programa Mega 6.0 (Tamura *et al.*, 2011) así como la construcción de la filogenia mediante el método de máxima verosimilitud (ML por sus siglas en inglés) a partir del modelo evolutivo de mejor ajuste con un soporte nodal evaluado vía *bootstrap* con 1000 replicaciones usando el programa Mega 6.0. Se utilizaron como grupo externo secuencias de *Petriella sordida* (CBS 575.71) y *Petriella setifera* (CBS 395.69) obtenidos de la base de datos GenBank ® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

4.2 Modelo murino de supervivencia

4.2.1 Cepas

Se trabajó con 10 cepas utilizadas para el estudio de carga fúngica realizado por Elizondo Zertuche (2014)¹⁸, como una continuación de los estudios de carga fúngica para evaluar la virulencia de las diversas especies aisladas del complejo *S. apiospermum* en México.

Tabla 4. Cepas utilizadas en el estudio de carga fúngica.

Cepa	Especie	Origen
00-320	<i>S. apiospermum</i>	Lavado bronquial. Nuevo León, México
120-MS	<i>S. apiospermum</i>	Jardín urbano. Morelos, México
08-1370	<i>S. boydii</i>	Lavado bronquial. Nuevo León, México
112-CL	<i>S. boydii</i>	Jardín de casa, Coahuila, México
175-HG	<i>S. aurantiacum</i>	Jardín urbano, Hidalgo, México
118-DF	<i>S. aurantiacum</i>	Jardín urbano, DF, México
003-NLA	<i>S. dehoogii</i>	Lodo PTA, Nuevo León, México
103-NLA	<i>S. dehoogii</i>	Jardín urbano, Nuevo León, México
147-OC	<i>P. angusta</i>	Jardín urbano, Oaxaca, México
169-JC	<i>P. angusta</i>	Parque deportivo, Jalisco, México

4.2.2 Preparación del inóculo

El inóculo se preparó a partir de cultivos incubados durante 14 días a 30°C en medio ADS. Con una pipeta pasteur estéril se agregó 5 mL solución salina estéril en la placa, se raspó la superficie de la misma para obtener una suspensión de conidios y micelio. Se transfirió a tubos de 50 mL filtrando la suspensión con una gasa estéril, para obtener una suspensión exclusivamente de conidios. Se realizaron diluciones seriadas del concentrado de conidios para realizar un conteo en la cámara de Neubauer. Se realizaron ajustes en las diversas suspensiones de conidios para obtener inóculos de una concentración de 1×10^6 conidios/mL, verificando la concentración del inóculo mediante siembra en medio APD a 30°C

4.2.3 Estudio de supervivencia

Se trabajó con grupos de 10 ratones ICR machos de 4 semanas de edad inmunocompetentes por cada cepa, los animales se colocaron en grupos de 5 ratones por caja, los cuales contaron con acceso a comida y agua *ad libitum*. La infección se realizó con 0.2 mL del inóculo 1×10^6 conidios/mL de cada cepa a través de la vena caudal del ratón bajo los lineamientos establecidos por la **NOM-062-Z00-1999**. Se llevó a cabo un registro de las muertes ocurridas en un periodo de 30 días post-infección. Para corroborar la muerte por la infección fúngica se extrajeron en condiciones asépticas cerebro y bazo, los cuales fueron homogenizados en 1 mL de solución salina estéril para posteriormente sembrar 100 μ L en medio APD e incubar a 30°C por 7 días. Al terminar el periodo de estudio (día 30 post-infección) se sacrificaron los ratones sobrevivientes mediante dislocación cervical y se realizó el mismo procedimiento de corroboración.

4.2.4 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de la media de tiempo de supervivencia (MTS) para cada especie mediante el método de Kaplan-Meier, así como una comparación entre grupos con el test Log-Rank.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1 Amplificación por PCR de los genes D1/D2 y β -tubulina

La amplificación por PCR, con el juego de cebadores F63 y R635 del fragmento de la región parcial D1/D2 del ADNr de las 60 cepas del complejo *S. apiospermum*, dió como resultado amplificados de ~600 pares de bases (pb) para todas las cepas (Figura 2A). En algunos casos en la amplificación del gen β -tubulina con los cebadores Bt2a y Bt2b, se observaron dos bandas de ~6000 pb y ~400 pb, o únicamente la amplificación de una ellas (Figura 2B), esto no fue característico de alguna especie en particular.

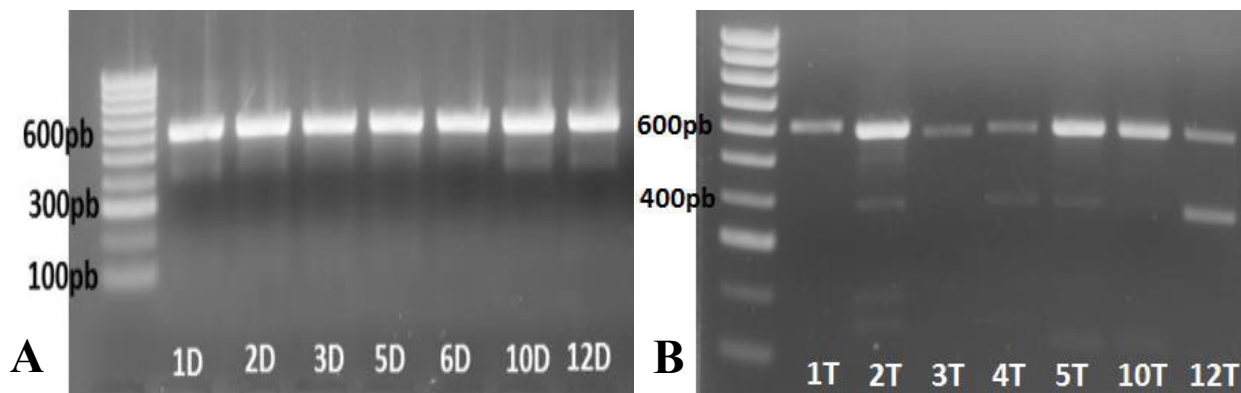


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 1.2% de fragmentos amplificados.

A) Amplificaciones del gen D1/D2 (~600pb), carril 1: marcador de peso 100pb, 1D: 00-320 *S. apiospermum*, 2D: 08-1370 *S. boydii*, 3D: 175-HG *S. aurantiacum*, 5D: 003-NL *S. dehoogii*, 6D: 103-NL *S. dehoogii*, 10D: 025-ZS *S. boydii*, 12D: 147-OC *P. angusta*. **B)** Amplificaciones del gen β -tubulina (~600pb) y (~400pb), carril 1: marcador de peso 100pb, 1T: 00-320 *S. apiospermum*, 2T: 08-1370 *S. boydii*, 3T: 175-HG *S. aurantiacum*, 4T: 118-HG *S. aurantiacum*, 5T: 003-NL *S. dehoogii*, 10T: 025-ZS *S. boydii*, 12T: 147-OC *P. angusta*.

5.2 Identificación mediante análisis de las secuencias

Los resultados de los porcentajes de similitud obtenidos a partir del alineamiento con el programa BLAST y con la base de datos Mycobank para la identificación de los 60 aislamientos con los genes D1/D2 y β -tubulina se muestran en la Tabla 5, así mismo, se muestran los cambios encontrados en la identificación realizada previamente por Elizondo Zertuche con la región ITS en la nueva base de datos ISHAM-ITS.

Se obtuvieron porcentajes de similitud mayores o iguales al 99% en todas las cepas con el marcador D1/D2. Con la región ITS, 8 cepas (13%) obtuvieron valores menores de similitud del 98.5%, mientras que el restante 87% obtuvo porcentajes mayores o iguales de 99%. El gen β -tubulina en el 25% de las cepas obtuvo porcentajes menores de 98% de similitud.

El análisis de las secuencias ITS en la base de datos ISHAM-ITS arrojó un total de 6 especies: *S. boydii*, *S. apiospermum*, *S. aurantiacum*, *S. dehoogii*, *P. angusta* y *P. ellipsoideum* (Figura 3B), en comparación con las 7 especies inicialmente reportadas por Elizondo Zertuche (Figura 3A). *S. apiospermum* pasó a ser el de mayor frecuencia con 31 cepas, seguido por *S. boydii* con 13 cepas, *S. aurantiacum* 7 cepas, *S. dehoogii* 5 cepas, *P. angusta* 3 cepas y *P. ellipsoidea* 1 cepa.

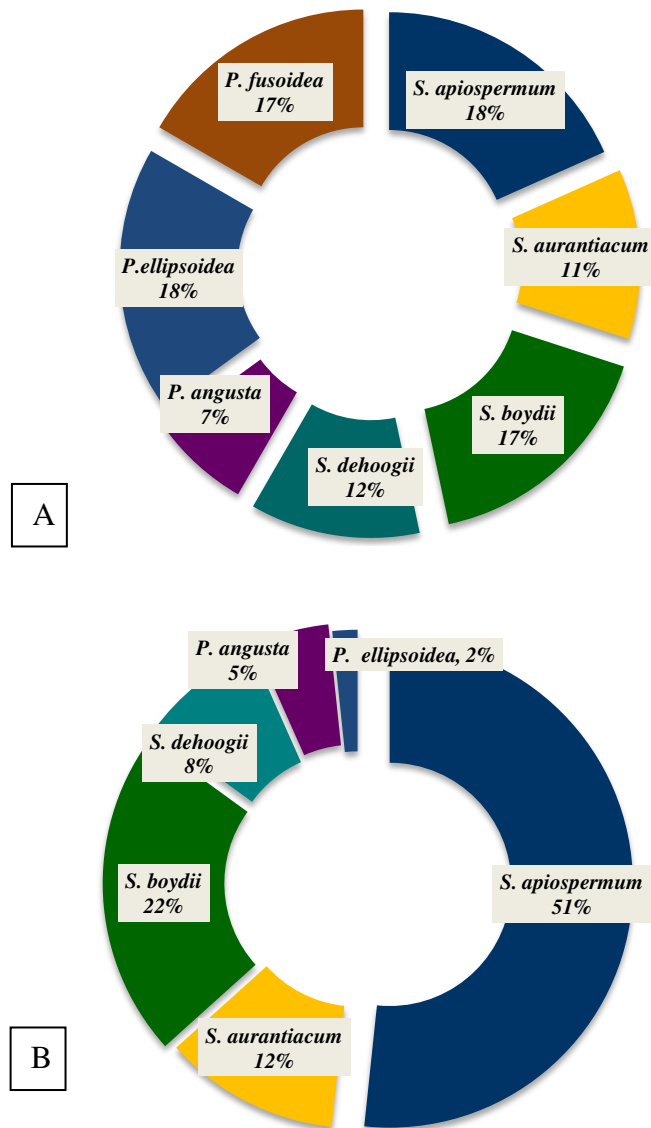


Figura 3. Comparación de los cambios realizados en las identificaciones.
A) Identificación inicial con la secuencia el gen ITS en la base de datos del GenBank. **B)** Identificación con la secuencia del gen ITS en la nueva base de datos ISHAM-ITS.

Tabla 5. Resultados de los porcentajes de similitud obtenidos en BLAST en la identificación molecular de las 60 cepas del complejo *S. apiospermum* con los tres marcadores moleculares utilizados.

Cepa	Identificación ITS	Identificación ISHAM-ITS	Identificación D1/D2	Identificación Tub
171-HG	<i>S. aurantiacum</i>	<i>S. aurantiacum</i> 100%	<i>S. aurantiacum</i> 100%	<i>S. aurantiacum</i> 99%
174-HG		<i>S. aurantiacum</i> 100%	<i>S. aurantiacum</i> 100%	<i>S. dehoogii</i> 97%
176-HG		<i>S. aurantiacum</i> 100%	<i>S. aurantiacum</i> 100%	<i>S. apiospermum</i> 95%
164-GR		<i>S. aurantiacum</i> 100%	<i>S. aurantiacum</i> 100%	<i>S. aurantiacum</i> 99%
175-HG		<i>S. aurantiacum</i> 100%	<i>S. aurantiacum</i> 100%	<i>S. aurantiacum</i> 99%
118-DF		<i>S. aurantiacum</i> 99%	<i>S. aurantiacum</i> 99%	<i>S. dehoogii</i> 99%
070-MC		<i>S. aurantiacum</i> 99%	<i>S. aurantiacum</i> 100%	<i>S. aurantiacum</i> 99%
002-NLA	<i>S. dehoogii</i>	<i>S. dehoogii</i> 100%	<i>S. dehoogii</i> 99%	<i>S. dehoogii</i> 99%
005-NLA		<i>S. boydii</i> 97%	<i>S. boydii</i> 99%	<i>S. boydii</i> 100%
006-NLA		<i>S. dehoogii</i> 100%	<i>S. dehoogii</i> 99%	<i>S. dehoogii</i> 99%
013-NLA		<i>S. dehoogii</i> 100%	<i>S. dehoogii</i> 99%	<i>S. dehoogii</i> 98%
003-NLA		<i>S. dehoogii</i> 100%	<i>S. dehoogii</i> 99%	<i>S. dehoogii</i> 97%
103-NLA		<i>S. dehoogii</i> 100%	<i>S. dehoogii</i> 99%	<i>S. dehoogii</i> 99%
019-NL		<i>S. boydii</i> 98%	<i>S. boydii</i> 99%	<i>S. boydii</i> 100%
044-BC	<i>S. apiospermum</i>	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>P. boydii</i> 99%	<i>P. boydii</i> 99%
079-BC		<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 87%
060-VZ		<i>S. apiospermum</i> 100%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 97%
028-QR		<i>S. apiospermum</i> 100%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%
108-GT		<i>S. apiospermum</i> 100%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%
109-GT		<i>S. apiospermum</i> 100%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%
148-OC		<i>S. apiospermum</i> 100%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 98%
149-OC		<i>S. apiospermum</i> 100%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%
00-320		<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 97%
112-CL		<i>S. boydii</i> 98%	<i>P. boydii</i> 99%	<i>S. boydii</i> 99%
127-CH		<i>S. apiospermum</i> 100%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%
043-BC	<i>S. boydii</i>	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%
077-BC		<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%
102-QR		<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%
057-VZ		<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 98%

066-TS		<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%
097-YN		<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%
130-SP		<i>S. apiospermum</i> 98%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 100%
08-1370		<i>S. boydii</i> 100%	<i>P. boydii</i> 99%	<i>S. boydii</i> 99%
025-ZS		<i>S. apiospermum</i> 98%	<i>P. boydii</i> 99%	<i>S. boydii</i> 100%
140-BS		<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%
153-CC	<i>P. ellipsoidea</i>	<i>S. boydii</i> 99%	<i>P. boydii</i> 99%	<i>S. boydii</i> 99%
160-CC		<i>S. ellipsoideum</i> 99%	<i>P. boydii</i> 99%	<i>P. boydii</i> 97%
090-YN		<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 98%
131-SP		<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 100%
123-MS		<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%
68-TS		<i>S. apiospermum</i> 98%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%
129-TS		<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 100%
137-PL		<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%
035-CL		<i>S. boydii</i> 99%	<i>P. boydii</i> 100%	<i>S. boydii</i> 99%
120-MS		<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 100%
100-CH		<i>S. boydii</i> 94%	<i>S. boydii</i> 99%	<i>S. boydii</i> 99%
016-NL	<i>P. fusoidea</i>	<i>S. apiospermum</i> 98%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 98%
018-NL		<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%
022-DG		<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 100%
030-QR		<i>S. boydii</i> 99%	<i>P. boydii</i> 99%	<i>S. boydii</i> 99%
039-BC		<i>S. boydii</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%
046-BC		<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%
099-CH		<i>S. boydii</i> 97%	<i>S. boydii</i> 99%	<i>S. boydii</i> 99%
157-CC		<i>P. boydii</i> 99%	<i>S. boydii</i> 99%	<i>S. boydii</i> 98%
147-OC		<i>P. angustum</i> 99%	<i>P. angusta</i> 99%	<i>P. angusta</i> 99%
158-CC		<i>S. boydii</i> 99%	<i>S. boydii</i> 99%	<i>S. boydii</i> 99%
034-CL	<i>P. angusta</i>	<i>S. boydii</i> 99%	<i>S. boydii</i> 99%	<i>S. boydii</i> 100%
107-CL		<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%	<i>S. apiospermum</i> 99%
166-JC		<i>P. angustum</i> 99%	<i>P. angusta</i> 99%	<i>S. dehoogii</i> 94%
169-JC		<i>P. angustum</i> 99%	<i>P. angusta</i> 99%	<i>P. angusta</i> 99%

Con los genes D1/D2 y β -tubulina se identifican únicamente 5 especies (Figura 4A y B). *P. ellipsoideum* no se reconoce con los marcadores anteriormente mencionados. *S. apiospermum* fue la especie más frecuente con un total de 30 cepas, seguido de *S. boydii* con 15 cepas, *S. aurantiacum* con 7 cepas, *S. dehoogii* con 5 cepas y *P. angusta* con 3 cepas con el gen D1/D2.

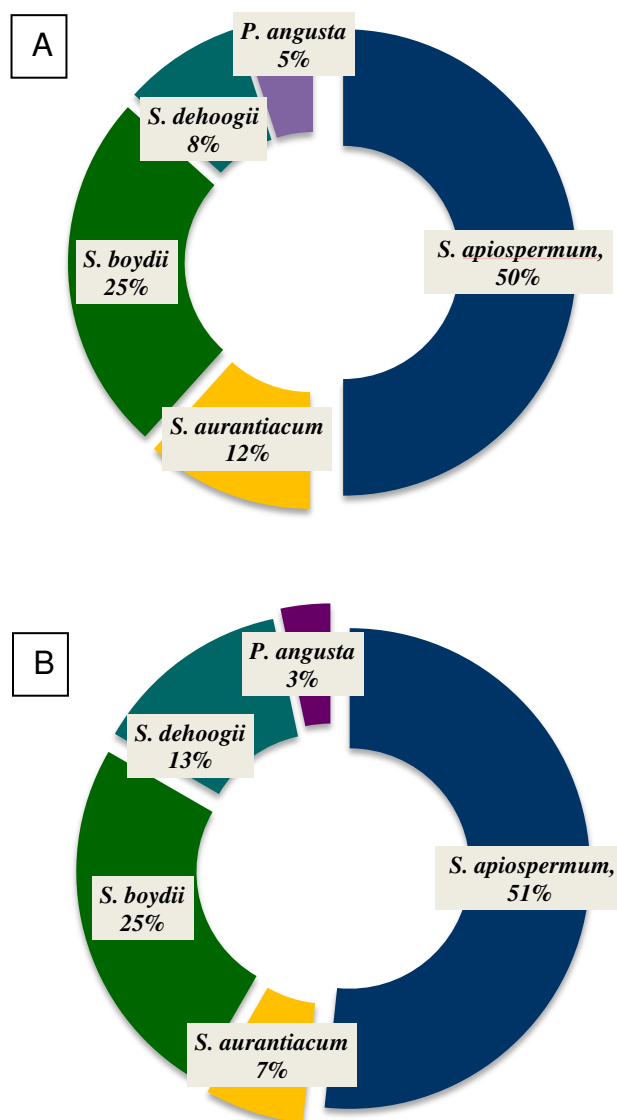


Figura 4. Comparación en porcentajes de las identificaciones con los diferentes marcadores.

A) Identificación con el gen D1/D2. **B)** Identificación con el gen β -tubulina.

Con el gen β -tubulina se pudieron identificar 31 cepas como *S. apiospermum*, 15 como *S. boydii*, 4 como *S. aurantiacum*, 8 como *S. dehoogii* y 3 como *P. angusta*.

5.4 Identificación mediante análisis filogenético

Se determinó la identificación mediante un análisis de máxima verosimilitud con los tres genes concatenados (ITS, D1/D2 y β -tubulina) basado en el modelo parámetro 2 de Kimura ⁶⁴. La búsqueda heurística se realizó mediante el método Neighbor-Joining utilizando el método de máxima verosimilitud Compuesto (MCL). El árbol obtenido muestra cinco clados principales: *S. aurantiacum*, *S. dehoogii*, *P. angusta*, *S. apiospermum* y *S. boydii*/*P. ellipsoidea*/*P. fusoidea* (Figura 5).

Se observó la formación de grupos para *S. apiospermum* y *P. angusta* en el árbol filogenético. Las cepas de referencia de *P. ellipsoidea* y *P. fusoidea*, se colocaron dentro del clado de las cepas de *S. boydii*, no se observa variabilidad entre las mismas. Las especies *S. aurantiacum* y *S. dehoogii* presentan un soporte nodal mayor al 80%, así mismo se observa una distancia génica capaz de diferenciar estas especies del resto del complejo.

P. angusta se colocó dentro del clado *S. boydii*/*P. ellipsoidea*/*P. fusoidea*, presentando un soporte nodal mayor al 60% distinguiendo estas cepas del resto del clado. Así mismo se observó una relación muy estrecha de este clado con *S. apiospermum*.

Con el análisis del dendograma de los tres genes se tiene que en total se identificaron 30 cepas como *S. apiospermum*, 15 como *S. boydii*, 7 como *S. aurantiacum*, 5 como *S. dehoogii* y 3 como *P. angusta*

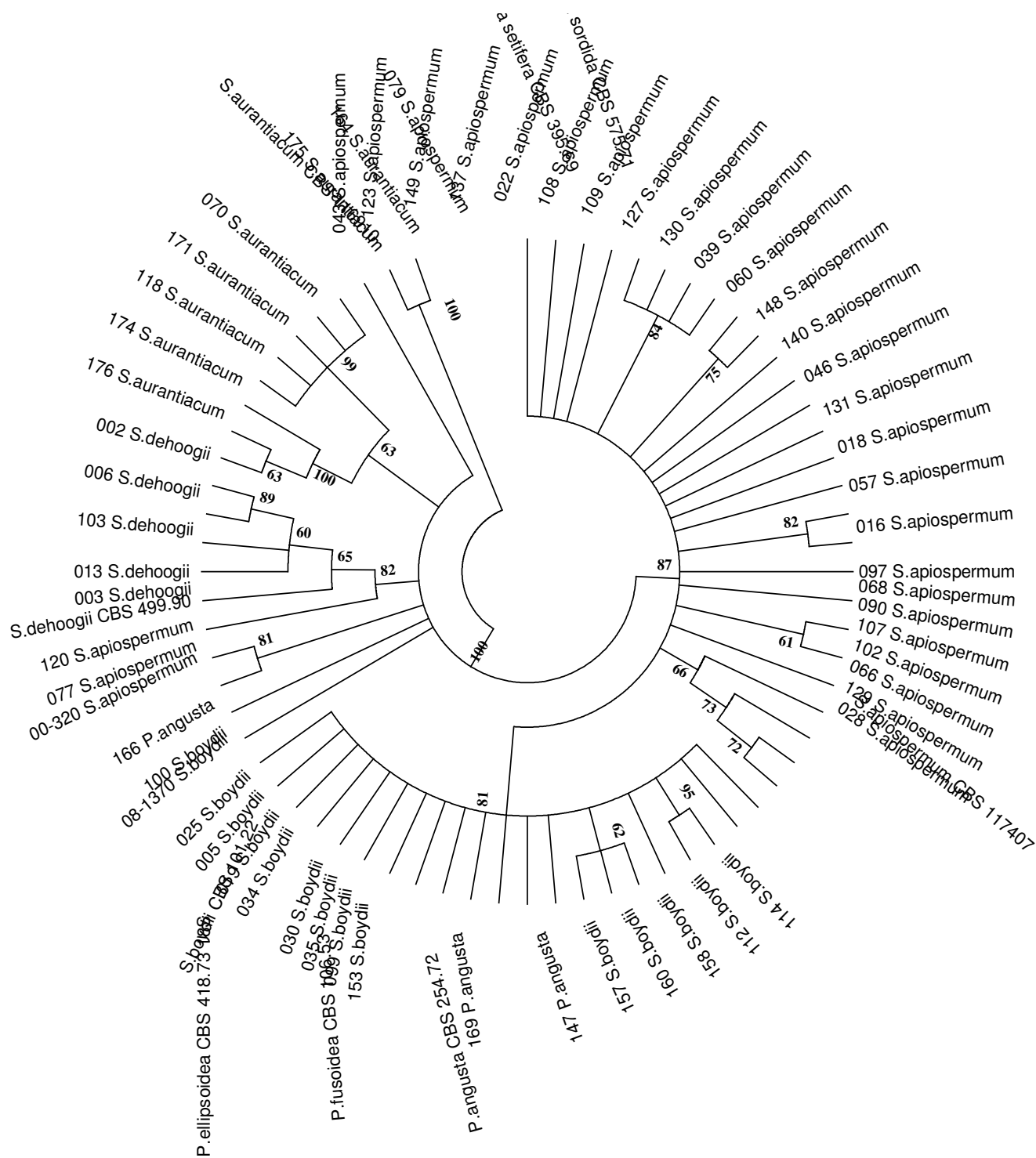


Figura 5. Árbol de máxima verosimilitud basado en las secuencias ITS, D1/D2 y β -tubulina para los 60 aislamientos del complejo *S. apiospermum*. Valores de bootstrap >60% indicado en los nodos.

En la Tabla 6 se muestran las identificaciones moleculares para los 60 aislamientos con base en los tres genes utilizados, así como el número de acceso de la base de datos del GenBank para las secuencias de los genes D1/D2 y β -tubulina de las especies del complejo *S. apiospermum*.

Tabla 6. Identificación molecular de los 60 aislamientos del complejo *S. apiospermum* con los números de acceso en la base de datos Genbank para los genes D1/D2 y β -tubulina

No. de referencia	Identificación molecular	No. de acceso Genbank	
		D1/D2	β -tubulina
147-OC	<i>P. angusta</i>	KX161775	KX620370
166-JC	<i>P. angusta</i>	KX161776	KX620371
169-JC	<i>P. angusta</i>	KX161777	KX620372
002-NLA	<i>S. dehoogii</i>	KX161778	KX620373
003-NLA	<i>S. dehoogii</i>	KX161779	KX620374
006-NLA	<i>S. dehoogii</i>	KX161780	KX620375
013-NLA	<i>S. dehoogii</i>	KX161781	KX620376
103-NLA	<i>S. dehoogii</i>	KX161782	KX620377
70-MC	<i>S. aurantiacum</i>	KX161783	KX620378
118-DF	<i>S. aurantiacum</i>	KX161784	KX620379
164-GR	<i>S. aurantiacum</i>	KX161785	KX620380
171-HG	<i>S. aurantiacum</i>	KX161786	KX620381
174-HG	<i>S. aurantiacum</i>	KX161787	KX620382
175-HG	<i>S. aurantiacum</i>	KX161788	KX620383
176-HG	<i>S. aurantiacum</i>	KX161789	KX620384
08-1370	<i>S. boydii</i>	KX161790	KX620385
005-NLA	<i>S. boydii</i>	KX161791	KX620386
019-NLA	<i>S. boydii</i>	KX161792	KX620387
25-ZS	<i>S. boydii</i>	KX161793	KX620388
30-QR	<i>S. boydii</i>	KX161794	KX620389
34-CL	<i>S. boydii</i>	KX161795	KX620390
35-CL	<i>S. boydii</i>	KX161796	KX620391
99-CH	<i>S. boydii</i>	KX161798	KX620392
100-CH	<i>S. boydii</i>	KX161799	KX620393
112-CL	<i>S. boydii</i>	KX161800	KX620394
153-CC	<i>S. boydii</i>	KX161801	KX620395
157-CC	<i>S. boydii</i>	KX161802	KX620396
158-CC	<i>S. boydii</i>	KX161803	KX620397
160-CC	<i>S. boydii</i>	KX161804	KX620398
16-NL	<i>S. apiospermum</i>	KX161805	KX620399

18-NL	<i>S. apiospermum</i>	KX161806	KX620400
22-DG	<i>S. apiospermum</i>	KX161807	KX620401
28-QR	<i>S. apiospermum</i>	KX161808	KX620402
39-BC	<i>S. apiospermum</i>	KX161809	KX620403
43-BC	<i>S. apiospermum</i>	KX161810	KX620404
46-BC	<i>S. apiospermum</i>	KX161811	KX620405
57-VZ	<i>S. apiospermum</i>	KX161812	KX620406
60-VZ	<i>S. apiospermum</i>	KX161813	KX620407
66-TS	<i>S. apiospermum</i>	KX161814	KX620408
68-TS	<i>S. apiospermum</i>	KX161815	KX620409
77-BC	<i>S. apiospermum</i>	KX161816	KX620410
79-BC	<i>S. apiospermum</i>	KX161817	KX620411
90-YN	<i>S. apiospermum</i>	KX161818	KX620412
97-YN	<i>S. apiospermum</i>	KX161819	KX620413
102-QR	<i>S. apiospermum</i>	KX161820	KX620414
107-CL	<i>S. apiospermum</i>	KX161821	KX620415
108-GT	<i>S. apiospermum</i>	KX161822	KX620416
109-GT	<i>S. apiospermum</i>	KX161823	KX620417
120-MS	<i>S. apiospermum</i>	KX161824	KX620418
123-MS	<i>S. apiospermum</i>	KX161825	KX620419
127-CH	<i>S. apiospermum</i>	KX161826	KX620420
129-TS	<i>S. apiospermum</i>	KX161827	KX620421
130-SP	<i>S. apiospermum</i>	KX161828	KX620422
131-SP	<i>S. apiospermum</i>	KX161829	KX620423
137-PL	<i>S. apiospermum</i>	KX161830	KX620424
140-BS	<i>S. apiospermum</i>	KX161831	KX620425
148-BC	<i>S. apiospermum</i>	KX161832	KX620426
149-OC	<i>S. apiospermum</i>	KX161833	KX620427
00-320	<i>S. apiospermum</i>	KX161834	KX620428

5.5 Estudio de supervivencia

Todos los ratones infectados mostraron signos de una infección activa desde el primer día post-infección hasta el término del periodo de 30 días, en donde se pudo observar en diferentes grados: pilo erección, taquipnea, anorexia, aletargamiento, lesiones oculares y signos de daño neurológico como ataxia. A partir de los homogenizados de cerebro y bazo en los cultivos, se observaron colonias

algodonosas, blancas, algunas con pigmento amarillo en el medio (Figura 6). Microscópicamente se observaron hifas delgadas, septadas, con conidios ovales, concordando con las características descritas para el género *Scedosporium*.

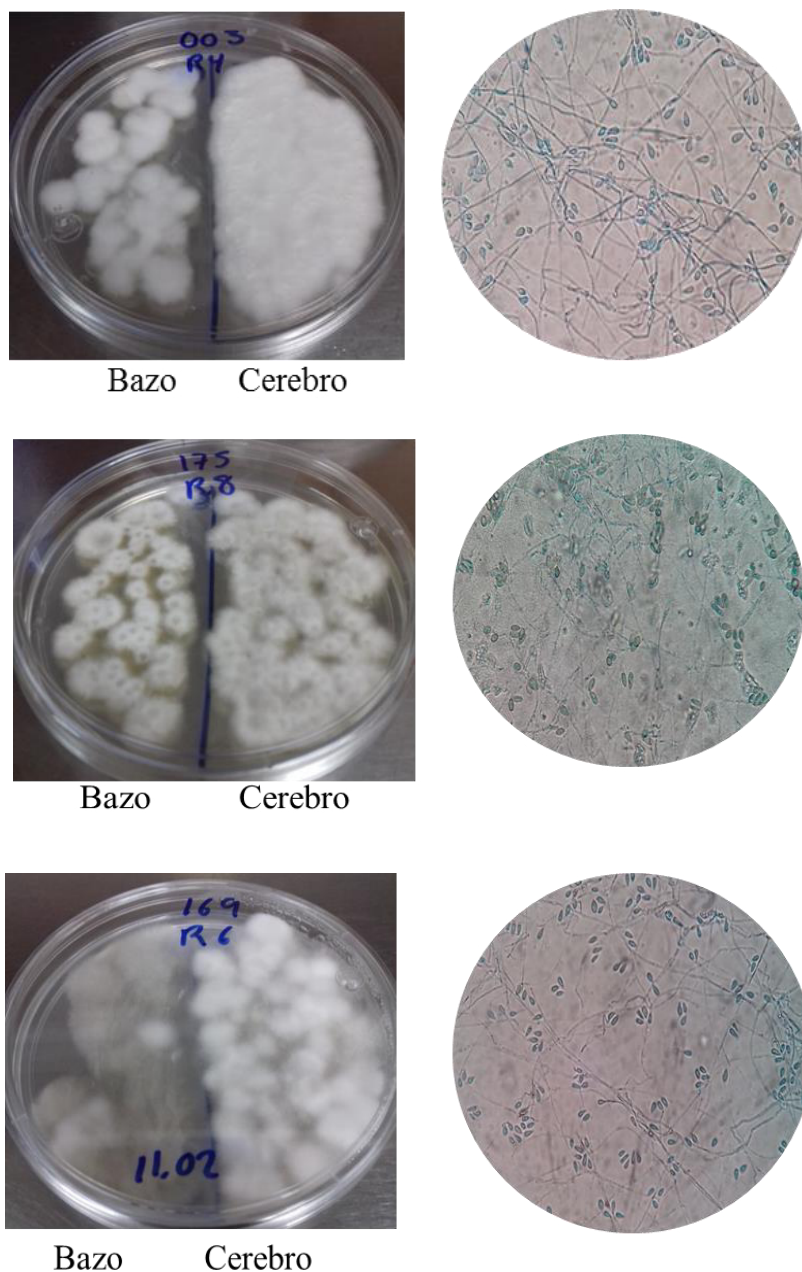


Figura 6. Cultivos en medio APD a partir de homogenizado de cerebro y bazo (izquierda). Microscopia de cultivos 40x (derecha) observando la presencia de hifas delgadas, septadas, con conidias ovales.

Los resultados de la infección sistémica causada por cepas del complejo *S. apiospermum* en un modelo murino de supervivencia en ratones inmunocompetentes se muestran en la Tabla 7. Se comparó la media de tiempo de supervivencia con el método estadístico Log Rank entre las dos cepas de cada especie. Con una $P>.344$ y $P>0.154$, las cepas de *S. boydii* (Figura 7A) y *P. angusta* (Figura 7C), no presentaron diferencia significativa, respectivamente. Entre las dos cepas de: *S. apiospermum* ($P<0.0001$) (Figura 7B), *S. aurantiacum* ($P<0.001$) (Figura 7D) y *S. dehoogii* ($P<0.0001$) (Figura 7E) existe una diferencia significativa. Todas las cepas son estadísticamente diferentes con una $P<0.001$. Las especies significativamente más virulentas causando la muerte a partir del primer día post-infección fueron las dos cepas de *S. aurantiacum*, *S. apiospermum* y la cepa 103NLA *S. dehoogii* con un 100% de mortalidad en todos los casos.

Tabla 7. Supervivencia de ratones infectados con especies del complejo *S. apiospermum*

Especie	Cepa	MTS [95% IC] (días)	Mortalidad (%)
<i>S. boydii</i>	112CL	9.9 (5.342-14.458) ^a	90
	081370	12.3 (7.891-16.709)	90
<i>S. apiospermum</i>	00320	2.4 (1.801-2.999) ^{*a}	100
	120MS	6 (4.760-7.240)	100
<i>S. aurantiacum</i>	175HG	4.8 (2.503-7.097) [*]	100
	118DF	1.8 (1.539-2.061) ^a	100
<i>P. angusta</i>	147OC	11.5 (7.098-15.902) ^a	90
	169JC	19.3 (12.670-25.930)	60
<i>S. dehoogii</i>	103NLA	2.6 (1.872-3.328) ^{*a}	100
	003NLA	14.3 (8.505-20.095)	80

MTS media del tiempo de supervivencia [95% intervalo de confianza].

^{*} Comparación entre dos cepas de la misma especie ($P<0.001$).

^a Comparación entre 00320 *S. apiospermum*, 118DF *S. aurantiacum*, 103NLA *S. dehoogii*, 112CL *S. boydii* y 147OC *P. angusta* ($P<0.001$)

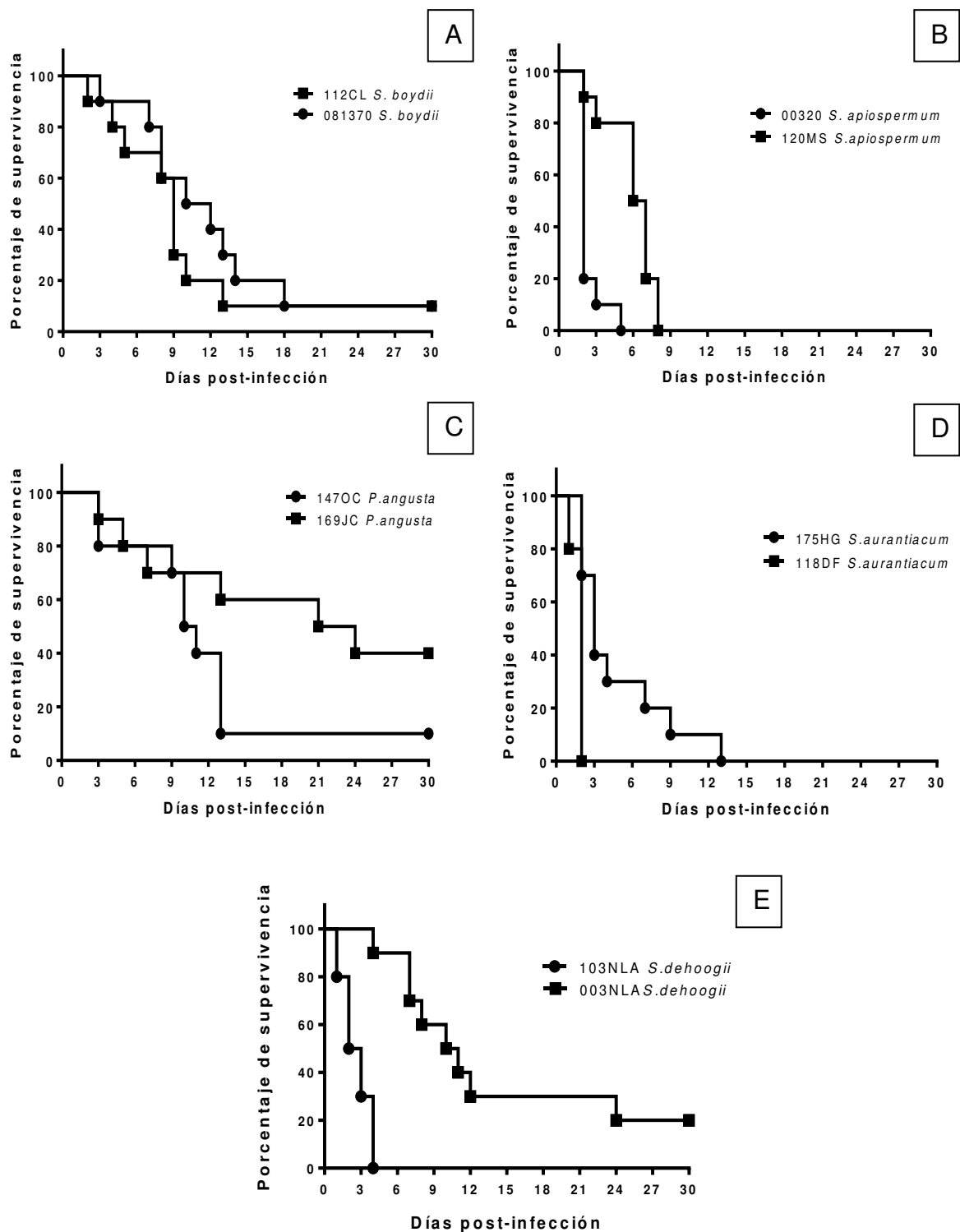


Figura 7. Graficas de supervivencia de ratones infectados con cepas del complejo *S. apiospermum*. A) Comparación entre dos cepas de *S. boydii*. **B)** Comparación entre dos cepas de *S. apiospermum*. **C)** Comparación entre dos cepas de *P. angusta*. **D)** Comparación entre dos cepas de *S. aurantiacum*. **E)** Comparación entre dos cepas de *S. dehoogii*.

Cada especie presentó una cepa significativamente más virulenta (Figura 8). En la comparación estadística de la MST entre las cepas: 103NLA *S. dehoogii*, 118DF *S. aurantiacum*, 147OC *P. angusta*, 00320 *S. apiospermum* y 112CL *S. boydii* existe una diferencia significativa con una $P<0.0001$ (Tabla 7). Entre las cepas: 103NLA *S. dehoogii*, 118DF *S. aurantiacum* y 00320 *S. apiospermum*, no hay una diferencia significativa ($P>0.125$). La cepa más virulenta fue 118DF *S. aurantiacum* con un MTS de 1.8 días en comparación con las demás cepas (Tabla 7). Las cepas 169JC *P. angusta*, 081370 *S. boydii* y 003NLA *S. dehoogii*, se comportaron de manera similar al ser significativamente menos virulentas en comparación con las otras especies, causando la muerte en un 60%, 90% y 80% de los ratones inmunocompetentes, respectivamente en el periodo de los 30 días.

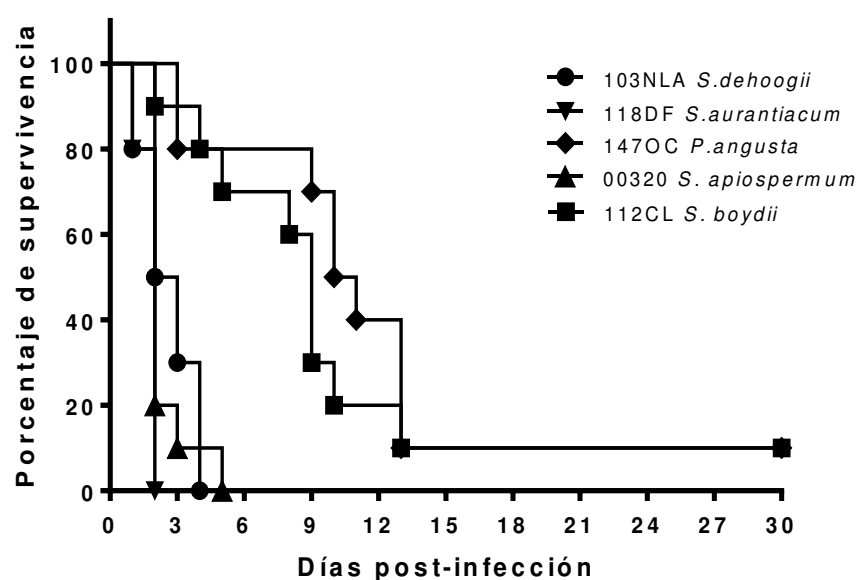


Figura 8. Gráfica de supervivencia de ratones infectados con las cepas más virulentas de las especies del complejo *S. apiospermum*.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

En este proyecto se corroboraron las identificaciones previamente realizadas con la secuenciación de la región ITS de los aislamientos realizados por Elizondo Zertuche con el uso de las secuencias de los genes D1/D2 y β -tubulina, encontrando un total de cinco clados conformados por *S. apiospermum* que fue la especie más frecuente, seguido de *S. boydii*, *S. aurantiacum*, *S. dehoogii* y *P. angusta*, las cuales forman parte del complejo *Scedosporium apiospermum*.

El uso de la secuenciación como método para la identificación precisa de las especies de este complejo aún está en debate ya que aún no se ha establecido de forma oficial un *barcoding* gap que permita discriminar las especies crípticas de este complejo, sin embargo, el uso del gen β -tubulina sigue siendo el más referenciado para la distinción entre las especies *S. boydii*, *S. apiospermum* y *P. angusta*.

En el análisis de las secuencias con la región ITS en la base de datos ISHAM-ITS, se encontró divergencia en 5 casos comparado con los resultados obtenidos con los marcadores D1/D2 y β -tubulina, identificando cuatro cepas como *S. apiospermum* y una como *S. ellipsoideum* con porcentajes de similitud del 99%, mientras que con los marcadores D1/D2 y β -tubulina se identificaron estas cinco cepas como *S. boydii* con porcentajes de similitud del 99% al 100% (Tabla 5). Esta limitación de discriminación entre las especies *S. apiospermum*-*S. boydii* y *S. boydii*-*P. ellipsoidea*-*P. fusoidea*

con el marcador ITS se reportó por Irinyin y col en 2015 en el estudio realizado por el ISHAM, en donde reportan que este marcador no presenta un barcoding gap, de tal modo que el uso único de este gen para la identificación de estas especies estrechamente relacionadas es cuestionable, por lo cual el uso adicional del gen β -tubulina para la discriminación de estas especies es necesario. Sin embargo en el estudio realizado por Chen y col en 2015 reportan la presencia de un barcoding gap para el gen ITS (0.042), así como un barcoding gap con el gen β -tubulina (0.038) en una región continua con rangos de aproximadamente 130 a 160pb en una alta proporción (>0.8) de especies relacionadas, sugiriendo el posible establecimiento de esta región como un barcoding gap para la identificación de las especies de este complejo.

El uso del gen β -tubulina como marcador adicional para la identificación precisa de las especies *S. apiospermum*, *S. boydii*, *P. fusoidea*, *P. ellipsoidea* y *P. angusta* ya ha sido reportado ^{10,11}. Sin embargo, a pesar de ser el mejor gen para la discriminación de las especies de este complejo, no se ha establecido aún algún barcoding gap de forma rutinaria en la identificación por medio de secuenciación.

Por otro lado, el uso de la región D1/D2 para la discriminación de las especies de este complejo ha tenido poca referencia, sin embargo para los cambios en la nueva nomenclatura del género *Scedosporium* y especies relacionadas, se basó en la secuenciación de este gen ⁴³, por lo cual, el uso de este marcador para la distinción de especies del complejo no debe de ser descartado. En este proyecto mostró ser un buen marcador para la identificación de las especies del complejo, sin embargo,

debido a la relación genéticamente estrecha que presentan algunos miembros del complejo, así como las pocas cepas de referencia con este gen, es necesario el uso del gen β -tubulina para corroborar las identificaciones.

La identificación para las especies *S. aurantiacum* y *S. dehoogii* realizadas con los genes ITS y D1/D2 (Tabla 5) correspondieron con las identificaciones finales realizadas mediante el análisis filogenético con los tres genes (Tabla 6), esto coincide con lo reportado por Irinyi *et al.* 2015, en donde encuentran que *S. aurantiacum* y *S. dehoogii* presentan una distancia intraespecie suficiente que los distingue de los otros integrantes del complejo, así mismo Chen y col. 2015 concluyen que el uso de la región ITS es suficiente para distinguir las especies *S. minutisporum*, *S. aurantiacum* y *S. dehoogii* y que éstas se deben de considerar fuera del complejo *S. apiospermum*.

En el estudio filogenético con los tres genes de este proyecto, se distinguió la formación de grupos de *S. apiospermum* y *P. angusta* (Figura 5), esto se reportó recientemente por Chen y col en 2015, donde encuentran la formación de grupos en *S. apiospermum*, *S. boydii* y *P. angusta* con las secuencias de los genes, β -tubulina, actina y la proteína ribosomal pequeña 60S L10. Estos mismos autores realizaron estudios *in silico* con estas especies encontrando recombinaciones con una ocurrencia del 13.5% en *S. apiospermum* y *S. boydii*. Sin embargo no encontraron recombinaciones en *P. angusta* debido al limitado número de cepas utilizadas en su estudio. La formación de estos subgrupos en nuestro estudio, posiblemente está

relacionada con la presencia de recombinaciones en estas especies, sin embargo, se requieren estudios adicionales para corroborar estos hechos.

Las cepas de referencia utilizadas de *P. ellipsoidea* y *P. fusoidea* se ubicaron en el clado de *S. boydii*. Este comportamiento lo reportaron Chen y col. 2015 afirmando que estas tres especies no presentan diferencias entre sí, por lo cual, deben de considerarse *P. ellipsoidea* y *P. fusoidea* como sinónimos de *S. boydii*.

P. angusta se ubicó dentro del clado de *S. boydii*, sin embargo el soporte nodal que presenta permite distinguirla de las cepas de *S. boydii*. A sí mismo, debido a la relación críptica observada por las especies *S. apiospermum*, *S. boydii* y *P. angusta*, Chen *et al.* 2015 proponen que estas tres especies deben de considerarse únicamente como integrantes del complejo *S. apiospermum*. Aún existe un desacuerdo con cuáles son las especies que pertenecen a este complejo.

Ya se han reportado estudios sobre la virulencia de algunas de las especies de este complejo. Gilgado *et al.*, en 2009 en un modelo de supervivencia en ratones inmunocompetentes, donde utilizaron cinco especies, encontrando que *S. dehoogii* y *S. aurantiacum* fueron las especies más virulentas al presentar mortalidades del 70% y 80% respectivamente, mientras que *S. apiospermum* y *S. boydii* presentaron una mortalidad del 20%. Contrario a lo que encontramos en nuestro estudio, en donde, *S. aurantiacum*, *S. apiospermum* y *S. dehoogii* fueron las especies más virulentas con mortalidades del 100%, mientras que *S. boydii* y *P. angusta* presentaron mortalidades del 90% y 60% respectivamente.

Hasta el momento no existen reportes de casos clínicos con la especie *S. dehoogii* como agente causal en una scedosporiosis. El primer estudio sobre la virulencia de esta especie fue realizado por Gilgado a partir de muestras ambientales, al igual que en este proyecto ⁶¹.

Sin embargo en un estudio de susceptibilidad *in vitro* de especies de este complejo, se utilizaron tres muestras de aislamientos clínicos de *S. dehoogii*, presentando los valores de CMI más altos para voriconazol ($>16 \mu\text{g/mL}$)⁵⁷. En dicho estudio sugieren que la ausencia de reportes de casos de scedosporiosis causados por este hongo, podría estar relacionado a una baja virulencia del mismo, lo cual contradice los resultados encontrados en este estudio y los previos reportados ⁶¹.

S. apiospermum y *S. boydii* son las especies con mayor prevalencia en aislamientos de muestras clínicas ^{19–21,24,65,66}. En nuestro estudio únicamente se obtuvieron aislados de muestras clínicas de *S. apiospermum* y *S. boydii* concordando con lo reportado.

Por otro lado, se han encontrado divergencias sobre la virulencia de cepas de la misma especie. Como en el estudio realizado por Nweze en Nigeria, sobre la virulencia de diferentes cepas de *S. apiospermum sensu stricto*, encontrando rangos desde 10% hasta 41% de mortalidad en ratones inmunocompetentes ⁶⁷. Estas diferencias en la virulencia de cepas de la misma especie no se han podido relacionar hasta el momento con factores como el origen del aislamiento, ya sea si es

a partir de una muestra clínica o ambiental, esto debido a los pocos estudios realizados así como el bajo número de cepas utilizadas en estos estudios.

En Australia, Harun y col. realizaron estudios de supervivencia con diferentes cepas de *S. aurantiacum* en ratones inmunocompetentes, encontrando que no todas las cepas tuvieron el mismo comportamiento de virulencia al presentar desde un 100% de mortalidad hasta un 60% ⁶². Esto concuerda con la virulencia encontrada en nuestras cepas, sin embargo, *S. aurantiacum* es la especie más virulenta con relación a la MTS presentada de 1.8 días, no se obtuvieron aislamientos de origen clínico en este estudio, contrario a lo reportado por Kaur y col en Australia donde este hongo es el segundo más frecuente, después de *Aspergillus fumigatus* en pacientes con fibrosis quística ²⁵.

Este es el primer estudio realizado sobre la virulencia de *P. angusta* mediante un modelo de supervivencia. Hasta el momento no existen reportes de casos de scedosporiosis causadas por este agente, sin embargo debido a la relación críptica con *S. boydii* y *S. apiospermum*, la cual dificulta la identificación precisa, podría estar limitando el reporte de la misma.

En este estudio se pudieron identificar cinco especies del complejo *S. apiospermum*, siendo las especies significativamente más virulentas *S. dehoogii*, *S. apiospermum* y *S. aurantiacum*. Sin embargo, en nuestro país, no se tienen reportes de casos de infecciones causadas por dichas especies, contrario a lo reportado en otros países como España y Australia, en los cuales, especies de este complejo son reportados

como el segundo hongo más frecuente en infecciones invasivas causadas por hongos filamentos diferentes del género *Aspergillus*²⁸. Conocer la virulencia de estas especies así, como la prevalencia de las mismas, brindará un mayor conocimiento que permitirá establecer una relación sobre la virulencia de estos hongos.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIÓN

La secuenciación de las regiones ITS y D1/D2 permiten discriminar de forma precisa las especies *S. aurantiacum* y *S. dehoogii* del complejo *S. apiospermum*, sin embargo *S. boydii*, *S. apiospermum* y *P. angusta* requieren además del gen β -tubulina para su identificación precisa.

S. aurantiacum, *S. dehoogii* y *S. apiospermum* presentaron una virulencia significativamente mayor que *S. boydii* y *P. angusta*.

CAPÍTULO 8

REFERENCIAS

1. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res.* 2007;111(5):509-547. doi:10.1016/j.mycres.2007.03.004.
2. Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol.* 2000;31(1):21-32. doi:10.1006/fgbi.2000.1228.
3. Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(1):33-39. doi:10.1016/j.eimc.2011.09.006.
4. Chen M, Zeng J, Hoog GSDE, Lackner M. The “ species complex ” issue in clinically relevant fungi : A case study in *Scedosporium apiospermum*. *Fungal Biol.* 2015;120(2):137-146. doi:10.1016/j.funbio.2015.09.003.
5. Rex JH, Pfaller MA. Has antifungal susceptibility testing come of age? *Clin Infect Dis.* 2002;35(8):982-989.
6. Araujo R, Oliveira M, Amorim A, Sampaio-Maia B. Unpredictable susceptibility of emerging clinical moulds to tri-azoles: review of the literature and upcoming challenges for mould identification. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34(7):1289-1301. doi:10.1007/s10096-015-2374-1.
7. Treviño-Rangel RDJ, Garza-González E, González JG, Bocanegra-García V, Llaca JM, González GM. Molecular characterization and antifungal susceptibility of the *Candida parapsilosis* species complex of clinical isolates from Monterrey, Mexico. *Med Mycol.* 2012;50(7):781-784. doi:10.3109/13693786.2012.675526.
8. Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, et al. Infections Caused by *Scedosporium* spp. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(1):157-197. doi:10.1128/CMR.00039-07.
9. Zeng JS, Fukushima K, Takizawa K, et al. Intraspecific diversity of species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Med Mycol.* 2007;45(6):547-558. doi:10.1080/13693780701435341.
10. Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J, Gene J. Molecular Phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* Species Complex: Proposal of Two New Species Molecular Phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* Species Complex: Proposal of Two New Species †. *J Clin Microbiol.* 2005;43(10):4930-4942. doi:10.1128/JCM.43.10.4930.
11. Gilgado F, Cano J, Gene J, Sutton DA, Guarro J. Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii*. *J Clin Microbiol.* 2008;46(2):766-771. doi:10.1128/JCM.01122-07.
12. Gilgado F, Gené J, Cano J, Guarro J. Heterothallism in *Scedosporium apiospermum* and description of its teleomorph *Pseudallescheria apiosperma* sp. nov. *Med Mycol.* 2010;48(1):122-128. doi:10.3109/13693780902939695.
13. Norvell LL. Fungal nomenclature. 1. Melbourne approves a new Code.

- Mycotaxon*. 2011;116:481-490. doi:10.5248/116.481.
14. Hawksworth DL. The amsterdam Declaration on Fungal Nomenclature. *Stud Mycol*. 2011;2(1):105-112. doi:10.5598/imafungus.2011.02.01.14.
 15. Giraud S, Bouchara J. *Scedosporium apiospermum* Complex: Diagnosis and Species Identification. 2014:211-219. doi:10.1007/s12281-014-0192-z.
 16. Kaltseis J, Rainer J, DeHoog GS. Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in human-dominated and natural environments and their distribution in clinical samples. *Med Mycol*. 2009;47(4):398-405. doi:10.1080/13693780802585317.
 17. Rougeron A, Schuliar G, Leto J, et al. Human-impacted areas of France are environmental reservoirs of the *Pseudallescheria boydii*/*Scedosporium apiospermum* species complex. *Environ Microbiol*. 2015;17(4):1039-1048. doi:10.1111/1462-2920.12472.
 18. Elizondo Zertuche M. Caracterización molecular y fenotípica de aislamientos clínicos y ambientales del complejo *Pseudallescheria boydii*. 2014:80.
 19. Wu ZMD, Ying, Howard M.D. PD, Yiu, Samuel M.D. PD, Irvine JMD, Smith RMD. *Fungal Keratitis Caused by Scedosporium Apiospermum: Report of Two Cases and Review of Treatmen*. 21, 519-523 (2002).
 20. Nulens E, Eggink C, Rijs AJMM, Wesseling P, Verweij PE. Keratitis caused by *Scedosporium apiospermum* successfully treated with a cornea transplant and voriconazole. *J Clin Microbiol*. 2003;41(5):2261-2264. doi:10.1128/JCM.41.5.2261-2264.2003.
 21. Guarro J, Kantarcioglu a S, Horr   R, et al. *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Med Mycol*. 2006;44(4):295-327. doi:10.1080/13693780600752507.
 22. Tammer I, Tintelnot K, Braun-Dulla  us RC, et al. Infections due to *Pseudallescheria*/*Scedosporium* species in patients with advanced HIV disease--a diagnostic and therapeutic challenge. *Int J Infect Dis*. 2011;15(6):e422-e429. doi:10.1016/j.ijid.2011.03.004.
 23. Issakainen J, Salonen JH, Anttila V-J, et al. Deep, respiratory tract and ear infections caused by *Pseudallescheria* (*Scedosporium*) and *Microascus* (*Scopulariopsis*) in Finland. A 10-year retrospective multi-center study. *Med Mycol*. 2010;48(3):458-465. doi:10.3109/13693780903161208.
 24. Cimon B, Carr  re J, Vinatier JF, Chazal  tte JP, Chabasse D, Bouchara JP. Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000;19(1):53-56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10706182>.
 25. Kaur J, Duan SY, Vaas LAI, Penesyan A. Phenotypic Profiling of *Scedosporium aurantiacum* , an Opportunistic Pathogen Colonizing Human Lungs. 2015:1-14. doi:10.1371/journal.pone.0122354.
 26. Bibashi E, de Hoog GS, Kostopoulou E, Tsivitanidou M, Sevastidou J, Geleris P. Invasive infection caused by *Pseudallescheria boydii* in an immunocompetent patient. *Hippokratia*. 2009;13(3):184-186. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2765299&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 27. Johnson LS, Shields RK, Epidemiology CJC. Epidemiology , clinical manifestations , and outcomes of *Scedosporium* infections among solid organ transplant recipients. 2014;2008:578-587. doi:10.1111/tid.12244.

28. Slavin M, Hal S Van, Sorrell TC, et al. Invasive infections due to filamentous fungi other than *Aspergillus*: epidemiology and determinants of mortality. *Clin Microbiol Infect.* 2015;In press(November 2014):1-10. doi:10.1016/j.cmi.2014.12.021.
29. Tintelnot K, Wagner N, Seibold M, de Hoog GS, Horré R. Re-identification of clinical isolates of the *Pseudallescheria boydii*-complex involved in near-drowning. *Mycoses.* 2008;51 Suppl 3:11-16. doi:10.1111/j.1439-0507.2008.01579.x.
30. Li C-S, He X-H, Wu J-Y, Wu C-J, Halm-Lutterodt N, Zhang J. *Scedosporium Apiospermum* Infection after Near-drowning. *Chin Med J (Engl).* 2015;128(15):2119. doi:10.4103/0366-6999.161401.
31. Chen T, Ho M, Chien W, Lin H. ScienceDirect Disseminated *Scedosporium apiospermum* infection in a near-drowning patient. *J Formos Med Assoc.* 2015;2-3. doi:10.1016/j.jfma.2015.02.007.
32. Rainer J, Kaltseis J, de Hoog SG, Summerbell RC. Efficacy of a selective isolation procedure for members of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol.* 2008;93(3):315-322. doi:10.1007/s10482-007-9206-y.
33. Giraud S, Rougeron A, Bouchara J. Scedo-Select III: a new semi-selective culture medium for detection of the *Scedosporium apiospermum* species complex *Tr am.* 2015;1-8. doi:10.1093/mmy/myv015.
34. Kaufman L, Standard PG, Jalbert M, Kraft DE. Immunohistologic identification of *Aspergillus* spp. and other hyaline fungi by using polyclonal fluorescent antibodies. *J Clin Microbiol.* 1997;35(9):2206-2209.
35. Thornton CR. Tracking the emerging human pathogen *Pseudallescheria boydii* by using highly specific monoclonal antibodies. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16(5):756-764. doi:10.1128/CVI.00061-09.
36. Pinto MR, Mulloy B, Haido RM, Travassos LR, Barreto Bergter E. A peptidorhamnomannan from the mycelium of *Pseudallescheria boydii* is a potential diagnostic antigen of this emerging human pathogen. *Microbiology.* 2001;147(Pt 6):1499-1506.
37. Steinmann J, Schmidt D, Buer J, Rath P-M. Discrimination of *Scedosporium prolificans* against *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium apiospermum* by semiautomated repetitive sequence-based PCR. *Med Mycol.* 2011;49(5):475-483. doi:10.3109/13693786.2010.539630.
38. Lu Q, Gerrits Van Den Ende a. HG, Bakkers JMJE, et al. Identification of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species by three molecular methods. *J Clin Microbiol.* 2011;49(3):960-967. doi:10.1128/JCM.01813-10.
39. Matray O, Mouhajir A, Giraud S, et al. Semi-automated repetitive sequence-based PCR amplification for species of the *Scedosporium apiospermum* complex. *Med Mycol.* 2015;myv080. doi:10.1093/mmy/myv080.
40. Wedde M, Müller D, Tintelnot K, De Hoog GS, Stahl U. PCR-based identification of clinically relevant *Pseudallescheria*/*Scedosporium* strains. *Med Mycol.* 1998;36(2):61-67. doi:10.1046/j.1365-280X.1998.00130.x.
41. Buelow DR, Gu Z, Walsh TJ, Hayden RT. Evaluation of multiplexed PCR and liquid-phase array for identification of respiratory fungal pathogens. *Med Mycol.* 2012;50(7):775-780. doi:10.3109/13693786.2012.666681.
42. Castelli M V., Buitrago MJ, Bernal-Martinez L, Gomez-Lopez A, Rodriguez-

- Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Development and validation of a quantitative PCR assay for diagnosis of scedosporiosis. *J Clin Microbiol.* 2008;46(10):3412-3416. doi:10.1128/JCM.00046-08.
43. Lackner M, de Hoog GS, Yang L, et al. Proposed nomenclature for *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and related genera. *Fungal Divers.* 2014;67(1):1-10. doi:10.1007/s13225-014-0295-4.
 44. Bouchara J-P, Hsieh HY, Croquefer S, et al. Development of an oligonucleotide array for direct detection of fungi in sputum samples from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2009;47(1):142-152. doi:10.1128/JCM.01668-08.
 45. Lu Q, van den Ende AHGG, de Hoog GS, et al. Reverse line blot hybridisation screening of *Pseudallescheria*/*Scedosporium* species in patients with cystic fibrosis. *Mycoses.* 2011;54(SUPPL. 3):5-11. doi:10.1111/j.1439-0507.2011.02108.x.
 46. Lackner M, Klaassen CH, Meis JF, van den Ende a HGG, de Hoog GS. Molecular identification tools for sibling species of *Scedosporium* and *Pseudallescheria*. *Med Mycol.* 2012;50(July):497-508. doi:10.3109/13693786.2011.618939.
 47. Lackner M, Najafzadeh MJ, Sun J, Lu Q, de Hoog GS. Rapid identification of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* strains by using rolling circle amplification. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(1):126-133. doi:10.1128/AEM.05280-11.
 48. Massire C, Buelow DR, Zhang SX, et al. PCR followed by electrospray ionization mass spectrometry for broad-range identification of fungal pathogens. *J Clin Microbiol.* 2013;51(3):959-966. doi:10.1128/JCM.02621-12.
 49. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci.* 2003;270(1512):313-321. doi:10.1098/rspb.2002.2218.
 50. Irinyi L, Serena C, Garcia-Hermoso D, et al. International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database--the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. *Med Mycol.* 2015;(advanced ePub):1-25. doi:10.1093/mmy/myv008.
 51. Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson KH. Intraspecific ITS variability in the Kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evol Bioinforma.* 2008;2008(4):193-201. doi:10.4137/EBO.S653.
 52. Schoch CL, Seifert K a., Huhndorf S, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(16):6241-6246. doi:10.1073/pnas.1117018109.
 53. Blaali R, Kumar S, Nilsson RH, Abarenkov K, Kirk PM, Kauserud H. ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Mol Ecol Resour.* 2013;13(2):218-224. doi:10.1111/1755-0998.12065.
 54. Meyer CP, Paulay G. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biol.* 2005;3(12):1-10. doi:10.1371/journal.pbio.0030422.
 55. González GM. In vitro activities of isavuconazole against opportunistic filamentous and dimorphic fungi. *Med Mycol.* 2009;47(February):71-76. doi:10.1080/13693780802562969.
 56. Pitisuttithum P, Negroni R, Graybill JR, et al. Activity of posaconazole in the treatment of central nervous system fungal infections. *J Antimicrob Chemother.*

- 2005;56(4):745-755. doi:10.1093/jac/dki288.
57. Lackner M, De Hoog GS, Verweij PE, et al. Species-specific antifungal susceptibility patterns of *Scedosporium* and *Pseudallescheria* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(5):2635-2642. doi:10.1128/AAC.05910-11.
 58. Desiree SR. Estudio de la distribución ambiental de los hongos del género *Scedosporium* en el País Vasco . técnicas moleculares . 2013.
 59. Meyer W, Guarro J. Current Status in Diagnosis of *Scedosporium* Infections: What Is the Impact of New Molecular Methods? *Curr Fungal Infect Rep*. 2014;8(3):220-226. doi:10.1007/s12281-014-0193-y.
 60. Capilla J, Clemons K V, Stevens D a. Animal models: an important tool in mycology. *Med Mycol*. 2007;45(8):657-684. doi:10.1080/13693780701644140.
 61. Gilgado F, Cano J, Gené J, Serena C, Guarro J. Different virulence of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Med Mycol*. 2009;47(4):371-374. doi:10.1080/13693780802256539.
 62. Harun A, Serena C, Gilgado F, Chen SC, Meyer W. *Scedosporium aurantiacum* is as virulent as *S. prolificans*, and shows strain-specific virulence differences, in a mouse model. *Med Mycol*. 2010;48(1):45-51.
 63. Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61(4):1323-1330. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=167388&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 64. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980;16(2):111-120. doi:10.1007/BF01731581.
 65. Cardoso JC, Serra D, Cardoso R, Reis JP, Tellechea O, Figueiredo A. Cutaneous *pseudallescheria boydii* infection in a renal transplant patient: A case report. *Dermatol Online J*. 2009;15(10):8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19951626>.
 66. Ong A, Blyth CC, Bency R, et al. Fatal mycotic aneurysms due to *Scedosporium* and *Pseudallescheria* infection. *J Clin Microbiol*. 2011;49(5):2067-2071. doi:10.1128/JCM.02615-10.
 67. Nweze EI, Okafor JI. Comparative virulence of *Scedosporium* species in animal models. *Braz J Infect Dis*. 2009;14(3):271-276. doi:10.1016/S1413-8670(10)70055-6.

ANEXO

Medio Sabouraud

Dextrosa 20gr

Peptona 10gr

Agar bacteriológico 20gr

Disolver todo en 1L de agua destilada y esterilizar en autoclave.

Solución SEVAGE (24:1)

Disolver 24mL de cloroformo con 1mL de alcohol isoamílico

Solución TAE 50X

Tris-Base 24.2gr

Ácido acético glacial 5.7mL

EDTA·2H₂O 1.86gr

Aforar a un volumen de 100mL con agua mili Q

Solución TAE 1X

Tomar 20mL de la solución TAE 50X y aforar a un volumen de 1L con agua mili Q

Solución de lisis enzimática

Tris-HCl pH 8 20mM 1000μl

EDTA 2mM 200μl

Triton x-100 1.2% 600μl

Disolver en 50mL de agua mili Q

Gel agarosa 1.2%

Agarosa 0.48gr

TAE 1X 40mL

Disolver la agarosa en la solución TAE 1X en un matraz, calentar en el microondas por 40s, agregar 40μl de Bromuro de etidio, vaciar en la cámara, colocar el peine y dejar solidificar.

Gel agarosa 2%

Agarosa 0.8gr

TAE 1X 40mL

Disolver la agarosa en la solución TAE 1X en un matraz, calentar en el microondas por 50s, agregar 40µl de Bromuro de etidio, vaciar en la cámara, colocar el peine y dejar solidificar.

Buffer de carga

Agua mili Q 500µl

Glicerol 500µl

Azul de bromofenol una pizca

Proteinasa K 10 mg/mL

Disolver 100 mg de Proteinasa K en 10 mL de Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 con SDS al 10% (Dodecil sulfato de sodio). Disolver poco a poco 5 g de SDS en 50 mL de agua destilada.

SDS al 1% (Dodecil sulfato de sodio)

Mezclar 5 mL de una solución de SDS al 10% en 50 mL de agua destilada.

TE 1X

Tris- HCl pH 8.0 500 mM 500 mL

EDTA 500 mM 50 mL

Mezclar y ajustar el pH a 8.0. Aforar a 25 mL de en agua destilada.

TE 1X con SDS al 1%

Disolver 1 g de SDS en 100 mL de TE 1X.

Tris-HCl 500 mM, pH 8 (Solución stock)

Disolver 30.3 g de TRIS base en 300 mL de agua ultra pura, ajustar el pH con HCl concentrado y aforar a 500 mL.

Acetato de sodio 3M pH 5

Disolver 12.3 g de acetato de sodio en 25 mL de agua destilada. Ajustar el pH con ácido acético glacial y aforar a 50 mL. Esterilizar en autoclave.

Bromuro de etidio 0.5 mg/mL (solución stock)

Disolver 25 mg de bromuro de etidio en 40 mL de agua ultra pura. Aforar a 50 mL y almacenar a 4°C protegido de la luz en un recipiente de vidrio ámbar.

EDTA 500 mM pH 8.0 (ácido etilen diamino tetracético).

Disolver 9.306 g de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 40 mL de agua ultra pura, ajustar el pH a 8.0 con lentejas de NaOH y aforar a 50 mL.

Etanol al 70%

Mezclar 70 mL de etanol al 100% más 30 mL de H₂O destilada estéril.

Fenol saturado

1. Destilación: Se funde el fenol a 68°C. Se procede a destilarlo si su aspecto al estar fundido no es cristalino (el fenol destila a una temperatura de 180°C, es recomendable no conectar agua circulante porque el fenol puede cristalizarse en el mismo refrigerante). El fenol que va destilando se puede recibir en un pequeño volumen de Tris- HCl 0.5 M para evitar su cristalización.

2. Saturación: Antes de comenzar la saturación, el fenol debe ser equilibrado a un pH mayor de 7.8 debido a que el DNA puede quedar dentro de la fase orgánica si el pH del fenol es ácido.

3. Agregar hidroxiquinoleína a una concentración final de 0.1% (función antioxidante).

4. Añadir un volumen de solución amortiguadora Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0 y mezclar con una barra magnética hasta que el pH de la fase fenólica sea mayor de 7.8 (medir con papel indicador).

5. Agitar durante 48 h a temperatura de refrigeración, dejar que se separen las fases y eliminar la fase acuosa utilizando una pipeta conectada a una línea de vacío con trampa o embudo de separación.
6. Repetir la misma operación pero utilizando solución amortiguadora Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0.
7. Eliminar la fase acuosa final y añadir 0.1 volúmenes de Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 conteniendo -mercaptoetanol a una concentración 0.2%.
8. La solución de fenol puede ser almacenada de esta forma en un frasco oscuro a -20°C, las alícuotas de fenol en uso se almacenan a 4°C.